

Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SAIS
DO GALATO DE DODECILA**

Ariana Centa

Orientadora: Tânia Beatriz Creczynski Pasa, PhD

Florianópolis, 2014

Ariana Centa

**CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SAIS
DO GALATO DE DODECILA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Fármacos-medicamentos.

Orientador: Tânia Beatriz Creczynski Pasa, PhD

Florianópolis
Fevereiro/2014

Ariana Centa

**CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SAIS
DO GALATO DE DODECILA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 07 de fevereiro de 2014.

Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Orientador - Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Membro Titular - Prof. Ionara Siqueira, Dr.^a
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Membro Titular - Prof. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Membro Titular - Iara Fabricia Kretzer, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dedico este trabalho aos meus pais,
Ari e Rosane, por fazerem dos meus
sonhos, os seus sonhos de cada dia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ari e Rosane, que me ensinaram a viver a vida com dignidade e respeito ao próximo; que se doaram por inteiro e sacrificaram seus sonhos para realizar os meus; obrigada por sempre acreditarem em mim!

Ao meu irmão, Júnior, e minha cunhada, Gabriele, por “cuidarem” dos nossos pais nos tantos momentos em que estive ausente.

À minha orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pelo voto de confiança, pelo incentivo em nunca desistir da pesquisa científica, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos, pelo exemplo de dedicação profissional.

Aos meus colegas de laboratório, sem os quais a jornada não seria a mesma: Adny, Laura, Júlia, Daiane, Evelyn, Carine, Milene, Fabíola, Fred, Jelver, Caio, Jocelane, Tatiane, Najla, Débora, Gabi, Ícaro, Jeff, Vera, Ivonete. Obrigada por todo o aprendizado profissional e pessoal compartilhado. Obrigada por fazerem a diferença no dia-a-dia do lab.

Em especial, às colegas que se tornaram grandes amigas e confidentes, que riram e choraram comigo nesses últimos anos. Obrigada por cada palavra! Adny, Jú. Lau e Dai, vocês são demais!

À Andréia Rosane de Moura Valim, minha professora de graduação da UNISC, que mesmo distante nunca deixou de me apoiar e incentivar.

À Claudriana Locatelli, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em ajudar e pelo grande exemplo de amor à pesquisa e à área acadêmica.

Às minhas amigas de infância, em especial Bru Passos, Pati, Loli e Bi pelo carinho, companheirismo, compreensão, incentivo e, principalmente, paciência em nunca deixarem a distância ou ausência atrapalharem a nossa amizade.

Ao pessoal do Laboratório Farmacêutico Elofar Ltda., por permitirem o meu afastamento ou meus horários malucos no primeiro semestre deste mestrado. Em especial, aos colegas da Garantia da Qualidade, por me apoiarem e incentivarem sempre. Ao Eduardo, meu gerente e supervisor, pela confiança depositada no meu trabalho. Obrigada por fazerem parte da minha história.

À Juliana Munari, que de colega de trabalho no Elofar, se tornou uma irmã. Obrigada pela nossa amizade! Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e independente de qualquer coisa.

Às minhas companheiras de apartamento desses últimos anos, em especial, à Alana, Cinthia, Anna, Luana, Marluce, Mari, Andréia, Tássia

e Maiara, pelo apoio, companheirismo, amizade, compreensão, convivência e por aturarem todos os meus altos e baixos. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos meus amigos de Floripa, em especial às Caróis, à Hary e à Mila, obrigada por todo o carinho, cumplicidade e acolhida.

À Regi, ao Xedes e à Alice, pelo incentivo profissional e pessoal, apoio, carinho e cuidado incondicionais.

A toda a minha família, em especial ao Tio Neco, Dinda Clarice, Tia Lica, Vô Arnildo, Vó Lira e Guto pelo carinho e amor durante essa jornada.

Ao Bruno, secretário do PGFAR, pela dedicação ao seu trabalho.

À CAPES, pela bolsa que permitiu a realização deste mestrado.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição.

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou a implementação deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste sonho.

*"A melhor maneira de nos prepararmos para o futuro, é concentrar toda a imaginação e entusiasmo na execução do trabalho de hoje."
Dale Carnegie.*

RESUMO

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial, sendo caracterizado pelo crescimento descontrolado das células. A incidência de tumores como leucemias, melanoma e câncer de mama vem aumentando a cada ano e a capacidade metastática das células tumorais é a principal causa de mortalidade por câncer. O início da formação de metástases é caracterizado pelo aumento da motilidade das células neoplásicas e por sua capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes ao tumor primário. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que degradam vários componentes da MEC, desempenhando um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento metastático. Alterações no ciclo celular e nas vias de apoptose ou nos respectivos mecanismos regulatórios também estão envolvidas nas malignidades humanas. Nesse contexto, novos medicamentos antitumorais e antimetastáticos devem ser desenvolvidos levando em consideração os princípios básicos da carcinogênese. O ácido gálico (AG) e seus derivados ésteres vêm apresentando diversas atividades biológicas. O galato de dodecila (G12) é bastante estudado como potencial agente antitumoral, no entanto, o composto é solúvel somente em solventes orgânicos. Para evitar a adição de solvente orgânico em ensaios biológicos foram sintetizados três sais do G12. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e os mecanismos de ação antitumoral do G12 e os derivados sais monossódico (GS12A), dissódico (GS12B) e trissódico (GS12C) em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), melanoma murino (B16-F10), melanoma humano (SK-mel-28) e câncer de mama humano (MDA-MB-231). A citotoxicidade dos compostos foi avaliada por citometria de fluxo, pela verificação da integridade da membrana celular em linhagens tumorais de leucemia, melanoma e câncer de mama e em linhagens não tumorais de fibroblasto e melanócito humanos (MRC-5e NGM, respectivamente). Os compostos apresentaram seletividade para as células tumorais em comparação com linhagens não tumorais em um tempo de tratamento de 48 horas. Verificou-se uma CC_{50} menor que 10 μ M para o G12 e entre 100 e 200 μ M para os sais em linhagens de L1210, B16-F10 e SK-mel-28, sendo que o sal GS12A apresentou maior citotoxicidade. Na avaliação do ciclo celular, não foi verificada a parada ou alteração no ciclo, mas aumento de morte celular, com elevação do número de células em Sub/G1, o que corresponde à fragmentação de DNA, nas linhagens testadas. Ainda, a capacidade de formar colônias

foi inibida nas linhagens B16-F10 e SK-mel-28 em doses subtóxicas. A morte celular por apoptose foi confirmada por citometria de fluxo, após coloração com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. Em linhagem L1210, foram observadas alterações morfológicas típicas de apoptose e ativação da caspase-3. A possível ação antimetastática do G12 e do GS12A foi avaliada verificando-se a capacidade invasiva das células de melanoma após o tratamento. Os compostos promoveram a inibição da migração e da invasão celular em linhagens B16-F10 e SK-mel-28. Nessas mesmas linhagens avaliou-se o efeito dos compostos sobre a atividade enzimática e expressão de MMP-2 e MMP-9. Sugere-se um potencial efeito antimetastáticos do G12 e do GS12A na inibição principalmente da expressão de MMPs, já que parecem não atuar diretamente na atividade das enzimas. Em conclusão, o presente estudo mostra que, apesar de apresentarem uma citotoxicidade mais baixa que seu precursor, os sais do G12 são potenciais agentes antitumorais e antimetastáticos, e apresentam seletividade, com destaque para o GS12A. Testes in vivo estão sendo realizados com o G12 e o sal monossódico, a fim de demonstrar a real importância da solubilidade dos compostos avaliados.

Palavras-chave: citotoxicidade, galato de dodecila, sais do G12, células de leucemia, células de melanoma, células de câncer de mama, apoptose, antimetastático.

ABSTRACT

Cytotoxicity and antitumor activity of dodecyl gallate salts derivatives

Cancer is considered a public health problem worldwide and is characterized by the uncontrolled cell growth and the incidence tumor such as leukemia, melanoma and breast cancer are increasing worldwide. The metastatic ability of tumor cells is the leading cause of cancer mortality. The early formation of metastases is characterized by increased motility of neoplastic cells and their ability to invade tissues and organs adjacent to the primary tumor. Metalloproteinases (MMPs) are enzymes that degrade various components of the ECM, playing an important role in various physiological and pathological processes, including metastatic development. Changes in cell cycle and apoptosis pathways or its regulatory mechanisms are involved in human malignancies. In this context, new antitumor and antimetastatic drugs should be developed taking into consideration the basic principles of carcinogenesis. Gallic acid (GA) and its ester derivatives have been presenting several biological activities including antitumor activity. Dodecyl gallate (G12) is extensively studied as potential antitumor agent, although the compound is only soluble in organic solvents. To avoid addition of organic solvent in biological assays G12's salts were synthesized. Thus, this study aims to evaluate the cytotoxic effects and the mechanisms of antitumor action of G12 and its monosodium (GS12A), disodium (GS12B) and trisodium (GS12C) salts in cell lines of murine acute lymphoblastic leukemia (L1210), promyelocytic leukemia human acute (HL-60), murine melanoma (B16-F10), human melanoma (SK-MEL-28) and human breast cancer (MDA-MB-231). Cytotoxicity was evaluated by flow cytometry analysis of cell membrane integrity in leukemia, melanoma and breast cancer cells and non-tumoral cell lines fibroblasts and human melanocyte (MRC-5 and NGM, respectively). G12 salts presented selectivity for tumor cells when compared to non-tumoral lines after 48 hour of incubation. On L1210, B16-F10 and SK-MEL-28 cell the CC_{50} was less than 10 μ M for G12 and longed between 100 and 200 μ M for G12 salt derivates. The GS12A presented the greatest cytotoxicity. No alterations in cell cycle were observed, however, an increased percentage of cells in Sub/G1 for both cell lines tested were observed indicating DNA fragmentation consequently cell apoptosis. Furthermore, the ability to form colonies

was inhibited in B16-F10 and SK-MEL-28 cells with subtoxic doses. After, double staining with annexin V-FITC and propidium iodide was performed using flow cytometry and the apoptosis process was confirmed in both leukemia and melanoma cell lines. In L1210 cells, typical morphological changes of apoptosis and also activation of caspase-3 were observed. The possible antimetastatic action of G12 and GS12A was evaluated by checking the invasive capacity of melanoma cells after treatment. The compounds promoted the inhibition of cell migration and invasion in B16-F10 and SK-mel-28 cells. In these same cell line it was evaluated the effect of compounds on enzyme activity and expression of MMP-2 and MMP-9. We suggest a potential antimetastatic effect of G12 and GS12A in inhibiting mainly the expression of MMPs, as they seem not act directly on the enzyme activity. In conclusion, G12 salts demonstrated lower cytotoxicity to non-tumoral cells and potential antitumor and antimetastatic activity against leukemia and melanoma cells lines. The higher selectivity was observed especially for salt A. In vivo tests are being performed with G12 and the salt A in order to evaluate if the higher solubility will maintain or improve the antitumoral properties of G12.

Keywords: cytotoxicity, dodecyl gallate, G12 salts, leukemic cells, melanoma cells, breast cancer cells, apoptosis, antimetastatic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das fases do ciclo celular: fases G1, S e G2 (interfase) e fase M (mitose celular). Pontos de checagem em G2/M e G1/S.....	39
Figura 2: Mecanismo de morte celular: apoptose.....	42
Figura 3: Principais vias apoptóticas: extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial), dependente ou não de caspases.....	43
Figura 4: Estrutura química do AG e dos derivados ésteres com 8 e 12 carbonos na cadeia lateral, o galato de octila (G8) e o galato de dodecila (G12), respectivamente.....	46
Figura 5: Mecanismos de ação dos galatos. Locatelli e colaboradores apresentaram os prováveis alvos do AG e seus derivados nas células tumorais.....	48
Figura 6: Linhagens celulares: (A) B16-F10, (B) SK-mel-28, (C) MDA-MB-231, (D) L1210, (E) HL-60, (F) NGM e (G) MRC-5. 200x Nikon, Eclipse TS100.....	56
Figura 7: Ciclo celular de L1210 (A), B16-F10 (B) e SK-mel-28 (C) após 48 horas de tratamento com G12 (10 e/ou 50 μ M) e os sais (50, 100 e 200 μ M). Os resultados estão expressos em percentual. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, n = 3.....	74
Figura 8: Inibição da formação de colônias em linhagens celulares de melanoma, B16-F10 e SK-mel-28, após 7 dias de tratamento com G12 (0,5 e 1,0 μ M) e os sais (30 μ M). A e B: Análise quantitativa da formação de colônias. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle sem tratamento. C e D: Imagens representativas da formação de colônias. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, n = 3.....	75
Figura 9: Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células L1210 tratadas com G12 (10 e 50 μ M) e os sais (50 e 100 μ M) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram	

marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo e a localização no gráfico corresponde ao tipo de morte celular: apoptose (quadrante inferior direito), necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia/dupla marcação (quadrante superior direito), viáveis (quadrante inferior esquerdo).....77

Figura 10: Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células B16-F10 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e os sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo e a localização no gráfico corresponde ao tipo de morte celular: apoptose (quadrante inferior direito), necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia/dupla marcação (quadrante superior direito), viáveis (quadrante inferior esquerdo).....78

Figura 11: Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células SK-mel-28 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e os sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo e a localização no gráfico corresponde ao tipo de morte celular: apoptose (quadrante inferior direito), necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia/dupla marcação (quadrante superior direito), viáveis (quadrante inferior esquerdo).....79

Figura 12: Alterações nucleares características da morte celular por apoptose observadas por microscopia de fluorescência com laranja de acridina/brometo de etídeo. Células L1210 tratadas com 10 μM de G12 e 100 μM de GS12A, GS12B e GS12C.....85

Figura 13: Avaliação do efeito do G12 (10 μM) e os sais (100 μM) sobre a atividade da caspase-3 em células L1210 após 4 horas de tratamento. A atividade das caspases está apresentada em percentual de unidades de fluorescência em comparação com grupo controle (células sem tratamento). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$82

Figura 14: Inibição da migração e motilidade de células B16-F10 frente à ação do G12 (5 μM) e GS12A (50 μM) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle). Utilização de meio sem soro. **A:** Imagens do processo de migração celular nos tempos 0, 24 e 48 horas após o tratamento. **B:** Quantificação da migração celular. Os

resultados estão apresentados em porcentual. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, n = 3.....84

Figura 15: Inibição da migração e motilidade de células SK-mel-28 frente à ação do G12 (5 μ M) e GS12A (50 μ M) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle). Utilização de meio sem soro. **A:** Imagens do processo de migração celular nos tempos 0, 24 e 48 horas após o tratamento. **B:** Quantificação da migração celular. Os resultados estão apresentados em porcentual. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, n = 3.....85

Figura 16: Efeito inibitório do G12 (2,5 e 5 μ M) e GS12A (50 e 75 μ M) na invasão de células de melanoma após 48 horas de tratamento. **A:** Quantificação da capacidade invasiva das linhagens celulares B16-F10 (A1) e SK-mel-28 (A2) tratadas em comparação com as células controle não tratadas. Os resultados estão apresentados em porcentual. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, n = 3. **B:** Visualização microscópica das células B16-F10 (B1) e SK-mel-28 (B2) com capacidade de invadir o matrigel.....86

Figura 17: Avaliação da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em células de B16-F10 após tratamento de 48 horas com G12 (0,5 μ M) e GS12A (50 e 75 μ M) em comparação com controle não tratado. **A:** Análise por zimografia. **B e C:** Quantificação da atividade da MMP-2 (B) e MMP-9 (C) verificada no ensaio de zimografia. Os resultados estão apresentados em porcentual, sendo a atividade do controle considerada 100%.....88

Figura 18: Avaliação da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em células de SK-mel-28 após tratamento de 48 horas com G12 (0,5 μ M) e GS12A (50 e 75 μ M) em comparação com controle não tratado. **A:** Análise por zimografia. **B e C:** Quantificação da atividade da MMP-2 (B) e MMP-9 (C) verificada no ensaio de zimografia. Os resultados estão apresentados em porcentual, sendo a atividade do controle considerada 100%.....89

Figura 19: Inibição da expressão de MMP-2 por RT-PCR em linhagem de B16-F10 frente ao tratamento com G12 (1,0, 2,0 e 3,0 μ M) e GS12A (25 e 50 μ M) em 16 horas de incubação. Os resultados estão apresentados em porcentual, sendo a expressão do gene verificada nas células controle considerada 100%.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das MMPs de acordo com o nome comum e substratos específicos.....	37
Tabela 2: Derivados n-alquil ésteres do AG: nomenclatura, radical substituinte e o valor de C Log P.....	47
Tabela 3: Citotoxicidade do AG e seus derivados. IC ₅₀ encontrada em diversos estudos que avaliaram a ação dos galatos frente à linhagens tumorais.....	49
Tabela 4: Determinação de CC ₅₀ do G12 e os sais em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210) e leucemia promielocítica aguda humana (HL-60) com tratamento de 24 horas.....	70
Tabela 5: Citotoxicidade do G12 e os sais frente a um painel de células tumorais e duas linhagens não tumorais. CC ₅₀ em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), melanoma murino (B16-F10), melanoma humano (SK-mel-28), câncer de mama humano (MDA-MB-231), melanócito humano (NGM) e fibroblasto humano (MRC-5) com tratamento de 48 horas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADAM	Domínio de metaloproteinases e desintegrinas
AG	Ácido gálico
AIF	Fator indutor de apoptose
AKT (PKB)	Proteína cinase B
AP-1	Ativador de proteína 1
APAF-1	Fator ativador de proteases – 1
ATP	Adenosina trifosfato
B16-F10	Linhagem de células de melanoma murino
Bax	Proteína pró-apoptótica
BCL-2	Proteína anti-apoptótica
BRAF	Proto-oncogene B-Raf (proteína cinase serina/treonina)
Calu-6	Linhagem celular de carcinoma de pulmão
CAMs	Moléculas de adesão celular
CAT	Catalase
CC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CCND1	Gene da ciclina D1
CDK	Ciclina dependente de cinase
CEM	Linhagem celular de leucemia linfóide aguda humana
COX	Ciclooxygenases
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dRLh-84	Linhagem celular de hepatoma de rato
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitelial-a-mesenquimal
ENDO G	Endonuclease G
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
Fas	Receptor de morte
FasL	Ligante do receptor de morte
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
G12	Galato de dodecila
G8	Galato de octila
GM05757	Linhagem celular de fibroblasto humano
GS12A	Sal monossódico do galato de dodecila
GS12B	Sal dissódico do galato de dodecila
GS12C	Sal trissódico do galato de dodecila
GSH	Glutathiona reduzida

HeLa	Linhagem celular humana imortal
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica humana
HTRA2	Proteína A2 de alta temperatura
HUH-7	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IκB	Proteína de regulação do NF-κB
K562	Linhagem celular de leucemia mieloide crônica humana
KB	Linhagem celular HeLa contaminada com papiloma vírus humano
KIT	Gene do receptor de tirosina cinase
KU812	Linhagem celular de leucemia humana
L1210	Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda murina
L929	Linhagem celular murina de fibrosarcoma aneuplóide
LAR	Leucemias agudas raras
LCT	Leucemia de células T
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LP	Leucemia pró-mielocítica
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MC1R	Receptor de melanocortina
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama humano
MRC-5	Linhagem celular de fibroblasto humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama humano
MEC	Matriz extracelular
MEK	Cinase relacionada ao sinal extracelular
MITF	Microftalmia
MMP	Metaloproteinase
MT-MMP	Metaloproteinase de membrana
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NGM	Linhagem celular de melanócito humano
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Coeficiente de partição
p21	Proteína reguladora do ciclo celular

P388-D1	Linhagem celular murina de linfoma
p53	Proteína de reparação do genoma
PARP	Poli ADP-ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato-salino
PgP	P-glicoproteína
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfoinositol-3-cinase
pKa	Grau de ionização
PKC	Proteína C cinase
PLC/PRF/5 HLE	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PR	Receptor de progesterona
pRb	Proteína do Rinoblastoma
PTEN	Proteína fosfatase e homólogo de angiotensina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SK-mel-28	Linhagem celular de melanoma humano
SMAC	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria
SOD	Superóxido dismutase
THP-1	Linhagem celular leucemia monocítica aguda humana
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
Wehi 231	Linhagem celular murina de linfoma de células B
XP	Genes xeroderma pigmentosos
γ GCS	γ glutamil sintase
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 Câncer e seus aspectos gerais.....	33
2.2 Metástase tumoras	34
2.3 Metaloproteínas	36
2.4 Ciclo celular.....	39
2.5 Morte celular.....	40
2.5.1 Apoptose	42
2.6 Novas estratégias terapêuticas	44
2.6.1 Ácido gálico e seus derivados	45
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 METODOLOGIA	55
4.1 Reagentes	55
4.2 Compostos	55
4.3 Cultura de Células	56
4.4 Tratamento Celular	57
4.5 Ensaio de viabilidade celular	57
4.6 Concentração citotóxica (CC ₅₀)	58
4.7 Ciclo celular	58
4.8 Coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo	59
4.9 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio ...	60
4.10 Avaliação da atividade das caspase 3.....	60
4.11 Ensaio clonogênico	61
4.12 Migração celular (<i>Scratch Assay</i>)	62
4.13 Invasão celular	62
4.14 Atividade de metaloproteínas – Ensaio de zimografia	64
4.15 Expressão de metaloproteínas	65
4.15.1 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA).....	65
4.15.2 Reações em cadeia da Polimerase (PCR).....	65
4.16 Análise estatística	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Citotoxicidade	69
5.2 Tipo de morte celular	75
5.3 Atividade antimetastática	82
6 CONCLUSÃO	93

7 PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE A – Avaliação do Ciclo Celular: Histogramas	115
APÊNDICE B – Avaliação do tipo de morte celular: Tabelas com o percentual de células por quadrante em gráficos de pontos	119

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer converteu-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Para 2030, são esperados 27 milhões de casos no mundo (BRASIL, 2013).

O câncer é uma enfermidade multifatorial crônica que causa graves danos à saúde e que se origina de mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos que causam alterações na atividade celular normal. A formação da massa tumoral ocorre lentamente, sendo que a proliferação e o crescimento descontrolado de células são a base dessa neoplasia. Além disso, a capacidade de driblar os mecanismos de morte celular programada, a indução de angiogênese e a capacidade metastática são características evidenciadas do desenvolvimento tumoral (HANAHA; WEINBERG, 2000; ALMEIDA et al., 2005; CROCE, 2008).

Além dessas características básicas que envolvem a carcinogênese, os mais de 100 tipos de câncer conhecidos apresentam características específicas, de acordo com o órgão ou tipo de célula em que a doença se inicia. Entre os cânceres, a incidência de leucemias, melanoma e câncer de mama vêm aumentando nas últimas décadas, tornando-se alvos de muitos estudos, principalmente pelo mau prognóstico (WHO, 2013).

A produção de metástases, ou seja, a capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes ao tumor primário é a principal causa de mortalidade por câncer. Os principais sítios de invasão dos tumores metastáticos são o pulmão e o fígado (GUPTA; MASSAGUE, 2006; KRAMER et al., 2013).

O desenvolvimento de metástase envolve vários processos, tais como o crescimento e infiltração através da matriz extracelular (MEC) para o tecido adjacente, a migração de células através de vasos sanguíneos ou linfáticos e o extravasamento e sobrevivência no sistema circulatório bem como a proliferação subsequente para outros órgãos, onde ocorrerá a colonização (ZIJJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011; GUPTA; MASSAGUE, 2006).

O início da formação de metástases é caracterizado pelo aumento da motilidade das células neoplásicas e pela respectiva capacidade de invasão. Em nível molecular, a capacidade invasiva e migratória envolve principalmente moléculas de adesão celular, proteases e proteínas reguladoras da reorganização do citoesqueleto de actina, uma vez que a degradação da MEC é um ponto crítico nesse processo (MCGARY et al., 2002; HIRANO et al., 2013).

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que degradam vários componentes da MEC e da membrana basal, desempenhando um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento metastático de tumores sólidos (COUSSENS; WERB, 1996; EGEBLAD; WERB, 2002; KESSENBROCK et al., 2010; ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011; CHAUDHARY et al., 2013). Entre as MMPs, uma alta expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9 está relacionada ao mau prognóstico da doença (VASALA; PAAKKO, 2003; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2003; VÄISÄNEN et al., 2011).

Mutações genéticas nas células podem superar os mecanismos de defesas e controle do ciclo celular, como por exemplo, no processo de apoptose. Quando componentes celulares essenciais como a proteína p53 são danificados, a chance de células geneticamente danificadas serem eliminadas diminui, iniciando um processo carcinogênico (ALBERTS et al., 1994; STANLEY, 2001; BRENNAN; SYRJANEN, 2003).

Quando o assunto é tratamento antitumoral, entre os mecanismos de morte celular, a apoptose ainda é o mais buscado, pois é considerado um processo “limpo”, sem causar inflamação. Esse mecanismo de morte ocorre em duas fases, a de indução e a de execução, que culminarão na destruição da célula e eliminação por macrófagos. Na fase de indução ocorre a ativação de vários receptores que deflagram uma cascata de transdução e, na fase de execução, ocorre a ativação das caspases e/ou alterações da função mitocondrial (GRIMM et al., 2011).

Nesse contexto, novos medicamentos antitumorais e antimetastáticos devem ser desenvolvidos levando em consideração os princípios básicos da carcinogênese (KRAMER et al., 2013). Entre as moléculas mais estudadas, cita-se os compostos extraídos de plantas e/ou derivados semissintéticos, entre eles o ácido gálico (AG).

Vários derivados ésteres do ácido gálico são estudados, sendo o galato de dodecila (G12) um dos mais ativos. No entanto, o composto é solúvel somente em solventes orgânicos, sendo dimetil sulfoxido (DMSO) o mais utilizado. Neste sentido foram obtidos os sais monossódico, dissódico e trissódico do galato de dodecila e posteriormente testá-los em modelos de leucemia (L1210 e HL-60), melanoma (B16-F10 e SK-mel-28) e câncer de mama (MDA-MB-231), realizando um paralelo com a ação e mecanismo de ação do éster G12.

O presente estudo visa incrementar o conhecimento sobre a ação de derivados do ácido gálico, por terem mostrado ação antitumoral em diversas linhagens tumorais e baixa toxicidade em estudos anteriores do

nosso grupo, *in vitro* e pré-clínicos. Eventualmente, uma patente poderá ser registrada, uma vez que não encontramos descrita na literatura a atividade biológica de sais de derivados do ácido gálico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer e seus aspectos gerais

Câncer é definido como uma enfermidade multifatorial crônica, com severos impactos na saúde humana. Na última década a incidência de câncer cresceu 20%, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, são esperados 27 milhões de casos de câncer no mundo, e para 2014 são esperados 576 mil novos casos no Brasil. Estudos estatísticos e epidemiológicos o apontam como responsável pela morte de oito milhões de pessoas anualmente em todo o mundo (BENSON; JATOI, 2012; PENET, 2013; YANG et al., 2013; BRASIL, 2013).

No estado neoplásico ocorre a proliferação e o crescimento celular de forma descontrolada originando células transformadas, decorrentes do colapso dos mecanismos normais de controle da proliferação e maturação das células. O processo que envolve o mecanismo dessas alterações de natureza molecular é denominado carcinogênese (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

As causas primárias das neoplasias são variadas e ainda não estão totalmente esclarecidas. No entanto, as causas principais estão relacionadas a alterações celulares e genéticas, espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos, as quais promovem alterações no ciclo celular e no processo de morte celular programada (ALMEIDA et al., 2005; CROCE, 2008).

A formação da massa tumoral ocorre lentamente. Na fase de iniciação, o agente carcinogênico atua sobre as células, causando alterações em genes, sem detecção clínica do tumor. Quando a célula modificada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual, diz-se que a doença está na fase de promoção. A fase de progressão é caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversível do processo, onde o tumor encontra-se instalado e a doença começa a manifestar-se clinicamente (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo HANAHAHAN e WEINBERG (2011), as características básicas do câncer compreendem capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores humanos: capacidade de sustentar a proliferação crônica e contornar os programas que regulam negativamente essa proliferação celular (ações dos genes supressores tumorais), resistência à morte celular programada, imortalização

replicativa, indução de angiogênese e capacidade de invasão e metástase. Ainda, a instabilidade do genoma (que gera a diversidade genética que acelera a progressão da doença) e a inflamação estão relacionadas ao processo carcinogênico.

A primeira meta do tratamento para câncer é a erradicação da doença, porém quando esta não pode ser alcançada, o objetivo passa a ser a busca de um tratamento paliativo, para melhorar os sintomas e a qualidade de vida do paciente (LONGO, 2010). Atualmente, busca-se um tratamento do câncer baseado em terapias-alvo, ou seja, baseadas nos mecanismos envolvidos na formação dos tumores. Assim, se uma função é importante para a biologia tumoral, a respectiva inibição deve prejudicar o crescimento e progressão do câncer. Dessa maneira busca-se diminuir a toxicidade inespecífica dos compostos utilizados. Mesmo com esse tipo de terapia, as recidivas ainda são inevitáveis (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Existem mais de 100 tipos de câncer e a maioria deles é nomeada de acordo com o órgão ou tipo de célula em que a doença se inicia. O câncer de pele não-melanoma é o de maior incidência no mundo em ambos os sexos. No sexo feminino, este tipo de câncer é seguido dos cânceres de mama, cólon e reto, além de colo do útero. Em homens, destacam-se as neoplasias de próstata, traqueia, brônquio e pulmão, além de cólon e reto. Apesar da prevalência desses tipos de cânceres, outros, como melanoma e leucemias, vêm adquirindo grande importância médica, devido ao aumento da incidência nas últimas décadas e, principalmente, pelo mau prognóstico e alta capacidade metastática (WHO, 2013).

2.2 Metástase tumoral

A habilidade das neoplasias malignas de produzirem metástase em órgãos distantes ao do tumor primário (origem) é um evento clínico de ocorrência letal em muitas doenças neoplásicas. A metástase é a principal causa de mortalidade por câncer, sendo que 90% das mortes causadas por tumores sólidos podem ser atribuídas à disseminação metastática. Os pulmões e o fígado estão entre os principais sítios de invasão dos tumores metastáticos, principalmente do melanoma (GUPTA; MASSAGUE, 2006; KRAMER et al., 2013).

O processo de desenvolvimento de metástase inicia-se através da infiltração das células tumorais através da MEC e dos tecidos adjacentes. Após isso, ocorre a migração das células através dos vasos

sanguíneos e linfáticos, até seu extravasamento através dos vasos para outros órgãos e tecidos, onde ocorrerá a colonização (ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011; GUPTA; MASSAGUE, 2006).

A migração é usada muitas vezes na biologia como termo genérico para descrever qualquer movimento da célula dentro do corpo. A capacidade de migrar permite às células mudar de posição no interior dos tecidos ou entre diferentes órgãos. Em patologia, invasão de carcinomas é definida como a penetração de barreiras dos tecidos, tais como a passagem da membrana basal e a infiltração para os tecidos intersticiais subjacentes por células de tumores malignos (KRAMER et al., 2013).

O início da metástase é caracterizado pelo aumento da motilidade das células neoplásicas e pela capacidade de invasão. Para adquirir tais habilidades invasoras, as células tumorais sofrem alterações fisiológicas, como a transição epitelial-a-mesenquimal (EMT). EMT é um processo onde as células perdem características epiteliais geralmente imóveis e ganham propriedades mesenquimais de mobilidade (HIRANO et al., 2013).

Em nível molecular, tais mudanças envolvem principalmente moléculas de adesão celular, proteases e proteínas reguladoras da reorganização do citoesqueleto de actina (MCGARY et al., 2002; SHI et al., 2011).

As moléculas de adesão celular (CAMs) são moléculas de superfície que intermediam a adesão entre duas células de um mesmo tipo e entre células de origens teciduais diferentes. Muitos tipos de moléculas podem ser mediadores da adesão celular, mas a maioria faz parte da família das integrinas, das caderinas e da superfamília das imunoglobulinas (CHOTIA; JONES, 1997; PAN et al., 2012).

A degradação da MEC é um ponto crítico no processo de metástase. Essa quebra requer a ativação de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases (COUSSENS; WERB, 1996; WOLF et al., 2003; WYCKOFF et al., 2006).

Apesar da grande infiltração no sistema circulatório, menos de 0,1% de células cancerosas disseminadas desenvolvem com sucesso metástases distais, pois a colonização subsequente é muito limitada pela incompatibilidade tecidual (FIDLER, 1970; FIDLER, 2005). As células tumorais latentes ou micrometástases, que representam populações de células cancerosas indetectáveis devido a uma parada do ciclo celular ou um equilíbrio entre proliferação e apoptose, pode, eventualmente, superar o tratamento e desenvolver macrometástases muitos anos depois

(CHAMBERS et al., 2002; ALMOG, 2010; WILLIS et al., 2010; ZIJL et al., 2011).

Novos medicamentos antimetastáticos devem ser desenvolvidos levando em consideração os princípios básicos da metástase. Nesse contexto, o maior desafio é monitorar a inibição, a migração e a invasão neoplásica, pois a metástase é um processo de múltiplos estágios e ocorre ao longo de meses ou mesmo anos (KRAMER et al., 2013).

2.3 Metaloproteinases

As metaloproteinases ou metaloproteases de matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases dependentes de zinco, capazes de degradar matrizes e membranas celulares, desempenhando um papel importante na invasão e metástase tumoral (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; DERYUGINA; QUIGLEY, 2006; VÄISÄNEN et al., 2011).

Estas enzimas degradam vários componentes da MEC e da membrana basal. MMPs desempenham um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento do embrião, a inflamação, a cura de feridas, angiogênese, imunidade, invasão tumoral e metástase (EGEBLAD; WERB, 2002; KESSENBROCK et al., 2010; ZIJL et al., 2011; CHAUDHARY et al., 2013).

Na maioria dos órgãos, os principais componentes da MEC são diferentes tipos de colágeno e outras proteínas, incluindo laminina, fibronectina, vitronectina e proteoglicanos. Várias MMPs têm sido relacionadas com a degradação da MEC, associada com o crescimento de tumores e angiogênese (ROY et al., 2009).

Não desenvolvimento de metástases, as MMPs atuam na clivagem das moléculas de adesão celular, tais como a E-caderina, na degradação de proteínas da MEC e no processamento e ativação de citocinas e fatores de crescimento (JOYCE; POLLARD, 2009).

BRUTO e LAPIERE descreveram pela primeira vez as MMPs em 1962 e, em 1968, a MMP foi purificada a partir de pele humana (EISEN et al., 2009). Essas proteases têm uma estrutura comum com três domínios, o pró-péptido, um sítio catalítico e um domínio semelhante a hemopexina-C-terminal. As MMPs são classificadas como collagenases, gelatinases, estromelisinases, novas MMPs e MMPs de membrana, de acordo com a respectiva função e substrato específico (Tabela 1) (CHAUDHARY et al., 2013).

Tabela 1: Classificação das MMPs: nome comum e substratos específicos.

Tipo de MMPs	Nome comum	Substratos
MMP-1	Colagenase-1	Colágeno II<I<III, VII, VIII, X, IX, caseína, perlecan, entactina, laminina, pró-MMP-1, 2, 9
MMP-8	Colagenase-2	Colágeno I> II> III> VII, VII, X, entactina, gelatina
MMP-13	Colagenase-3	Colágeno II> III> I, VII, X, XVIII, gelatina, entactina, tenascina, agrecana
MMP-18	Colagenase-4	Colágeno I, II, III, gelatina
MMP-2	Gelatinase A	Gelatina, fibronectina, elastina, laminina, colágeno I, III, IV, V, VII, X, XI, vitronectina, decorina, plasminogênio
MMP-9	Gelatinase B	Gelatina, Colágeno I, IV, V, VII, X, XI, XVIII, vitronectina, elastina, laminina, fibronectina, proMMP-9, proMMP-2
MMP-3	Estromelisina-1	Laminina, gelatina, agrecana, fibronectina
MMP-10	Estromelisina-2	Colágeno I, III, IV, gelatina, elastina, proMMP-1, 8, 10
MMP-11	Estromelisina-3	Fibronectina, laminina, agrecana, gelatina
MMP-12	Metaloelastase	Elastina, gelatina, colágeno I, IV, fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicano
MMP-7	Matrilisina-1	Colágeno I, IV, V, IX, X, XI, XVIII, fibronectina, laminina, gelatina, agrecana, gelatina, proMMP-9
MMP-26	Matrilisina-2	Gelatina, colágeno IV, proMMP-9
MMP-20	Enamelisina	laminina, amelogenina, agrecana
MMP-14	MT1-MMP	Colágeno I, II, III, agrecana, laminina, gelatina, proMMP-2, 13
MMP-15	MT2-MMP	Proteoglicanos, proMMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, fibronectina, proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	Gelatina, fibrinogênio, proMMP-2
MMP-24	MT5-MMP	Fibrinogênio, gelatina, proMMP-2
MMP-25	MT6-MMP	Colágeno IV, gelatina, proMMP-2, 9
MMP-19	Estromelisina-4	Colágeno I, IV, tenascina, gelatina, laminina
MMP-21	XMMP	Gelatina
MMP-22	CMMP	-
MMP-23	Cisteínas Array	Gelatina
MMP-27	CA-MMP	-
MMP-28	Epilisina	Caseína

Fonte: Adaptado de CHAUDHARY et al., 2013.

As gelatinases, que incluem a família dos genes MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B), são enzimas proteolíticas que permitem a hidrólise de gelatina, colágenos e outras moléculas presentes na MEC. O tamanho das gelatinases A e B é de 72 kDa e 92 kDa, respectivamente (AIMES; QUIGLEY, 1995; PATTERSON et al., 2001; VAN DEN STEEN; DUBOIS, 2002).

Estudos demonstram uma correlação entre a alta expressão de MMP-2 e/ou MMP-9 e a fase do tumor primário. Além disso, a superexpressão de gelatinases tem sido associada a um mau prognóstico da doença (VASALA; PAAKKO, 2003; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005; VÄISÄNEN et al., 2011).

Inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP) regulam a atividade das MMPs, afetam o crescimento celular, a apoptose e a diferenciação de tecidos. TIMP-1, forma um complexo com a proMMP-9, inativa as formas ativas de MMP-2 e MMP-9. TIMP-2 participa da ativação de MMP-2 através da formação de um complexo com a MT1-MMP (MMP de membrana), o qual funciona como um receptor para a proMMP-2 (BAKER et al., 2002; JIANG et al., 2002; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005). Nesse contexto, esses TIMPs apresentam caráter inibitório no evento metastático, enquanto outros contribuem para a progressão tumoral (VALENTE et al., 1998; HOFFMAN et al., 2005; VÄISÄNEN et al., 2011).

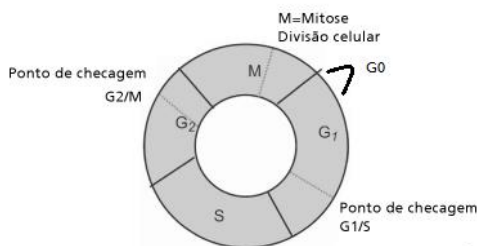
Geralmente, a MMP-2 é sobre expressa constitutivamente em tumores altamente metastáticos, ao passo que a MMP-9 pode ser estimulada por citocinas inflamatórias, fator de crescimento epidérmico (EGF) ou de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), através da ativação de vias de sinalização intracelular (KAJANNE et al., 2007).

Além disso, estimuladores, tais como citocinas e PMA, controlam a expressão de MMP-9, através da modulação da ativação dos fatores de transcrição tais como o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e do ativador de proteína 1 (AP-1) e através das vias de sinalização PK, PI-3K/AKT e MAPKs. Vários estudos indicaram que a inibição da MMP-9 pode afetar a atividade carcinogênica em muitas formas, incluindo a inibição da invasão, metástase e angiogênese (EBERHARDT et al., 2000; KIM et al., 2001; SATO et al., 2002; SHIN et al., 2007; BLACKBURN et al., 2007; KUNIGAL et al., 2007; CHO et al., 2007; LI; WU, 2010; WANG et al., 2011). Mutações no gene RAS contribuem para o aumento da motilidade, capacidade invasiva e potencial metastático de tumores. Estudos demonstram a ligação entre RAS e a regulação da expressão de MMPs (CAMPBELL; DER, 2004).

2.4 Ciclo celular

O ciclo celular é composto por quatro estágios, sendo classificadas em dois grandes grupos: aqueles que estão em processo de mitose (M) e aqueles que estão na interfase (G₁, S e G₂) (Figura 1). Na fase G₁, a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. Na fase seguinte, chamada de S (síntese), ocorre a replicação, na qual os cromossomos das células são precisamente duplicados. A partir da replicação cromossomal, a célula entra na fase G₂, na qual se prepara para entrar em mitose, a fase M. Na mitose, a célula-mãe se divide ao meio, produzindo duas células-filhas idênticas. As células-filhas imediatamente entram em fase G₁ e podem reiniciar o ciclo celular ou o mesmo pode ser interrompido. Ainda, quando necessário as células podem entrar em um estágio de latência (fase G₀) que precede a fase G₁ (ALBERTS et al., 1994; BRENNAN; SYRJANEN, 2003; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Figura 1: Representação das fases do ciclo celular: fases G₁, S e G₂ (interfase) e fase M (mitose celular). Pontos de checagem em G₂/M e G₁/S.



Fonte: Adaptado de ALBERTS et al. (1994) e STANLEY (2001).

Durante o ciclo celular existem pontos que regulam as transições de fase celulares, sendo chamados de pontos de checagem. A fase G₁ possui um ponto de checagem, G₁/S, controlado pela via do pRb (proteína do retinoblastoma). Uma vez que a célula passa este ponto, ela é compelida a replicar seu DNA. Caso ocorra a cópia incorreta do DNA durante a fase S ou lesão do DNA, a célula não passará o ponto de checagem G₂/M, e ocorrerá parada de crescimento e apoptose, induzidos pelo gene p53. Se esses pontos de checagem forem perdidos

em funções de danos ao DNA, a progressão do ciclo celular pode causar uma instabilidade genômica irreparável com a propagação da mutação para as células filhas (ELLEDGE, 1996; STANLEY, 2001; NITTA et al., 2004; CLARKE; ALLAN, 2009).

Ainda, existem proteínas reguladoras do ciclo celular, que podem inibir o avanço do mesmo. Entre elas, cita-se a p21, associada ao proto-oncogene RAS, e a p53, que verificam a saúde celular, a integridade dos cromossomos e a execução correta das fases do ciclo. Outros inibidores são o p15 e o p16, que atuam bloqueando componentes essenciais para progressão do ciclo celular (como, por exemplo, as ciclinas dependente de cinases, as CDK) e impedindo o avanço do ciclo da fase G1 para S (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997; BERTRAM, 2000; LINDQVIST et al., 2007).

Mutações no conteúdo genético das células podem superar os mecanismos de defesas e controle do ciclo celular e contribuir para a formação de neoplasias. Um exemplo é o processo de apoptose (morte celular programada), que ocorre quando componentes celulares essenciais estão lesados ou o controle do sistema desregulado. A inativação da proteína p53, que auxilia o início da apoptose, por mutação, reduz a chance de células geneticamente danificadas serem eliminadas, iniciando um processo carcinogênico (ALBERTS et al., 1994; STANLEY, 2001; BRENNAN; SYRJANEN, 2003). Outro mecanismo de controle da divisão celular limita o número de vezes que determinada célula se reproduz. Nesse mecanismo, o número de divisões é controlado pelos telômeros (pontas dos cromossomos), que marcam o número de divisões, e no momento apropriado iniciam o processo de senescência e morte, através da ação da telomerase. A ativação desta enzima induz à imortalização celular, evento indispensável para a carcinogênese (HANAHAHAN; WEINBERG, 2013).

2.5 Morte celular

Em 2012, os tipos de morte celular foram classificados levando-se em consideração o progresso bioquímico e genético na exploração dos mecanismos de morte celular. Assim, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death – NCCD) classificou morte celular em: necrose regulada, morte celular autofágica, mitose catastrófica e apoptose (extrínseca e intrínseca dependente ou independente de caspase) (GALLUZI et al., 2012).

Na autofagia, a célula forma vacúolos. É um mecanismo catabólico que leva à degradação lisossomal de estruturas citoplasmáticas pela formação de autofagossomos (KEPP et al., 2011; ROSENFELDT; RYAN, 2011).

A mitose catastrófica é caracterizada por condensação cromossomal prematura, formação de células grandes com múltiplos micronúcleos (CASTEDO et al., 2004; RELLO-VARONA, 2010; GALLUZZI et al., 2012). Ocorre como um mecanismo para evitar a instabilidade genômica causada por falhas no processo de mitose (CASTEDO et al., 2004; PORTUGAL; MANSILLA; BATALLER, 2010; VITALE, 2010).

A necrose ocorre quando a célula não atinge os níveis energéticos mínimos, comprometendo assim processos como a troca intracelular dos íons sódio/potássio, levando a um desequilíbrio osmótico que leva à ruptura da célula (ALTMAN; RATHMELL, 2012). Ocorre aumento das organelas, dilatação da membrana nuclear, condensação irregular da cromatina e aumento do volume celular, resultando na ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular (KROEMER; LEVINE, 2008; VITALE et al., 2011). A remoção dos restos celulares pelas células inflamatórias não acontece rapidamente, podendo gerar danos e até morte de células vizinhas. Nestas condições um grande número de células é afetado e, devido ao desencadeamento do processo inflamatório, ocorrem alterações irreversíveis nos tecidos ou órgãos (CURTIN et al., 2002). Devido ao processo inflamatório que, por sua vez, está diretamente ligada à tumorigênese, as estratégias que visam a ativação da apoptose continuam sendo mais interessantes (ALTMAN; RATHMELL, 2012).

Apoptose é uma morte celular programada, que não causa processos inflamatórios, sendo reconhecida como um importante mecanismo regulatório na manutenção tecidual e na prevenção de doenças (GRIMM et al., 2011).

A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento, no qual as células perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares. Nesse mecanismo, ocorre uma programação genética controlada pelos telômeros e pela ativação de genes supressores tumorais (DIMRI, 2005; LUM et al., 2005).

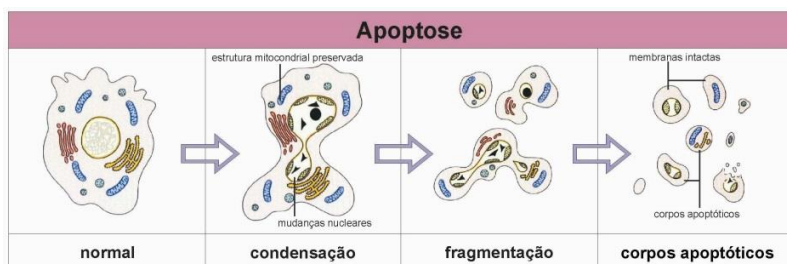
Ainda, pode-se citar outros tipos de morte, as chamadas vias alternativas, que não apresentam os mecanismos totalmente elucidados: anoiquia, entose, piroptose, netose e cornificação (GALLUZZI et al., 2012).

2.5.1 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular importante, dependente de energia e altamente regulado, cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido a ativação de proteases endógenas (PATEL, 2000; DANIAL; KORSMEYER, 2004).

Esse processo de morte celular envolve vários eventos, incluindo a síntese proteica, expressão de antígenos de superfície, perda da adesão celular, manutenção da atividade metabólica e produção de energia com preservação da integridade da membrana plasmática e de organelas citoplasmáticas (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000; KROEMER et al., 2009).

Figura 2: Mecanismo de morte celular: apoptose.



Fonte: Adaptado do Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação. Disponível em: <http://www.bioagency.com.br/informacao/default.asp>. Acesso em 27 de dezembro de 2013.

A célula apoptótica reorganiza o citoesqueleto celular, em resposta ocorre uma contração do volume citoplasmático. As endonucleases degradam o DNA, alterando características no núcleo celular: torna-se picnótico a cromatina condensa-se, o núcleo entra em colapso e fragmenta-se. As bolhas formadas no citoplasma celular separam-se em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas, resultando na formação dos corpos apoptóticos, que impedem o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular, não havendo resposta inflamatória (Figura 2). Quando isso ocorre, o fosfolípídeo fosfatidilserina, que normalmente

A via extrínseca ou citoplasmática é acionada através de sinais de estresse extracelulares que são monitorizados e propagados por receptores transmembrana, principalmente pelo receptor de morte Fas, membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF). Ocorre, então, ativação de caspases iniciadoras, que acionam as caspases executoras, causando a morte celular (MEHLEN; BREDESEN, 2011).

Quando a via intrínseca ou mitocondrial é ativada, ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (por exemplo, Bac e Bax) do citoplasma celular para a mitocôndria. Isso resulta na alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberando o citocromo c. O citocromo c associa-se a duas proteínas presentes no citoplasma celular, o fator ativador da apoptose 1 (Apaf-1) e a pró-caspase 9 para formar o apoptossoma, que na presença de ATP ativa caspase 9 que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 que executam o processo de apoptose. Ainda, SMAC/DIABLO (“second mitochondria-derived activator of caspases”/“direct IAP-binding protein with a low isoelectric point”) e HTRA2 (“high temperature requirement protein A2”) facilitam a ativação de caspases, sequestrando e/ou degradando vários membros da família de inibidores das proteínas da apoptose (IAPs). A via intrínseca também pode ocorrer de forma independente de caspases. O fator de indução de apoptose (apoptosis-inducing fator, AIF) e a endonuclease G (ENDOG) penetram no núcleo e promovem fragmentação do DNA. Nesse mesmo sentido, a HTRA2 exerce efeitos pró-apoptóticos independente de caspase por virtude de sua atividade de protease, através da clivagem de uma grande variedade de substratos celulares (incluindo as proteínas do citoesqueleto) (SUSIN et al., 1999; JOZA et al., 2000; CHAI et al., 2003; BRAS et al., 2005; BUTTNER et al., 2007; VANDE WALLE et al., 2007; GALLUZI et al., 2012).

As proteínas pró- e anti-apoptóticas desempenham um papel crítico na regulação da morte celular e estão presentes nas neoplasias (que podem apresentar mutações nessas proteínas), sendo potenciais alvos para fármacos (GRIMM et al., 2011; HAHM; SINGH, 2013).

2.6 Novas estratégias terapêuticas

O desenvolvimento de novos fármacos e/ou sistemas de entrega de compostos ativos e o descobrimento de novos alvos de ação são fundamentais para o avanço na terapia do câncer. As pesquisas sempre buscam uma maior seletividade para as células tumorais, diminuindo os

efeitos adversos nas células normais (CHAKRABARTIL et al., 2012). Além disso, efeitos reguladores sobre vias de sinalização celular e alterações genéticas têm sido bastante estudados como potenciais alvos de novas estratégias citotóxicas e antitumorais (PIMIENTO et al., 20013).

Em busca de novas alternativas terapêuticas, que visam driblar a carcinogênese e a resistência da mesma, estudos farmacológicos vem dando bastante atenção à pesquisa de compostos extraídos de plantas e/ou derivados semissintéticos (LOCATELLI; MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

Entre as classes de compostos naturais mais estudadas, os flavonoides tem recebido atenção especial. Constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza, estando presentes em uma grande variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados como chocolates, chás e vinho. Estudos já demonstraram atividades farmacológicas importantes dos flavonoides, como antitumoral, antialérgica, antiulcerogênica e antiviral (ARTS; HOLLMAN; KROMHOUT, 1999; ZUANAZZI, 2000; MAMEDE; CARDELLO; PASTORE, 2005).

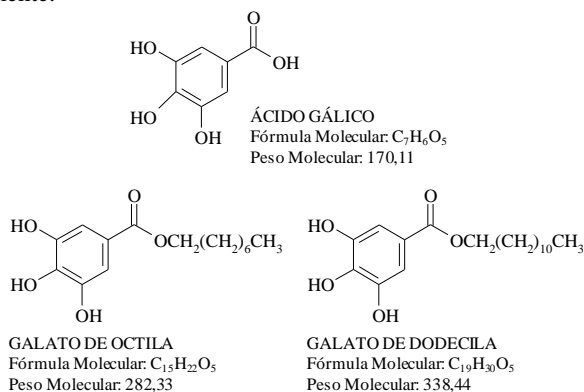
Ainda nesse contexto, moléculas obtidas do metabolismo secundário das plantas, como o ácido gálico, também podem apresentar atividades biológicas e serem utilizadas na química fina como protótipos para a síntese de derivados.

2.6.1 Ácido gálico e seus derivados

O ácido 3,4,5-triidróxibenzóico ou ácido gálico (AG) é um composto polihidróxifenólico (Figura 4) de ocorrência natural nas plantas obtido pela hidrólise dos taninos. É amplamente distribuído em plantas, frutas e alimentos e tem apresentado várias atividades farmacológicas (INOUE et al., 1995; NIEMETZ; GROSS, 2005).

Para otimizar ou alterar efeitos biológicos de compostos ativos, como o AG, podem ser realizadas modificações químicas na estrutura da molécula. Essas modificações podem influenciar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pois alteram a solubilidade, o coeficiente de partição (P) e o grau de ionização (pKa) (ANCEREWICZ et al., 1998; MEKAPATI et al., 2005).

Figura 4: Estrutura química do AG e dos derivados ésteres com 8 e 12 carbonos na cadeia lateral, o galato de octila (G8) e o galato de dodecila (G12), respectivamente.

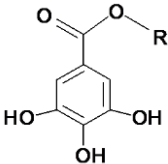


Um grande número de análogos ésteres do AG, com diferentes atividades farmacológicas, pode ser obtido por meio da introdução de variados substituintes na porção ácida da molécula (LOCATELLI, 2013). Desta maneira, 14 derivados n-alkil ésteres (Tabela 2) foram sintetizados por meio da esterificação da função ácida do AG com álcoois alifáticos. Os derivados se diferenciam pelo número de carbonos na cadeia lateral, o que também designa as respectivas nomenclaturas (LEAL et al., 2009).

O C Log P, ou seja, o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico é uma importante propriedade físico-química, pois descreve a hidrofobicidade da molécula. Assim, quanto maior o valor de C Log P, maior é a lipossolubilidade de um determinado composto químico e, conseqüentemente, maior é a sua interação com biomembranas (WANG, 1998).

Leal e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antifúngica dos derivados ésteres do AG, observando que a maior atividade não está diretamente ligada à maior hidrofobicidade. Os compostos com C Log P entre 2,5 e 4,5 foram os mais ativos, demonstrando que esta propriedade influencia na atividade biológica, mas que deve existir um balanço entre a hidrofobicidade e a hidrossolubilidade (uma faixa ideal de C Log P). Atualmente, para um fármaco atingir o seu local de ação, ele deve ser capaz de interagir com ambientes diferentes: lipofílicos, como as membranas, e aquosos, como o citoplasma (FIUZA et al., 2004).

Tabela 2: Derivados n-alquil ésteres do AG: nomenclatura, radical substituinte e o valor de C Log P.

	Abreviação	Galatos	-R	C Log P
	AG	Ácido gálico	-OH	0,89
	G1	Metil	-CH ₃	0,92
	G2	Etil	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	1,27
	G3	Propil	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	1,73
	G4	Butil	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	2,13
	G5	Pentil	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	2,53
	G6	Hexil	-(CH ₂) ₅ -CH ₃	2,92
	G7	Heptil	-(CH ₂) ₆ -CH ₃	2,32
	G8	Octil	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	3,72
	G10	Decil	-(CH ₂) ₉ -CH ₃	4,51
	G11	Undecil	-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃	4,90
	G12	Dodecil	-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	5,30
	G14	Tetradecil	-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃	6,09
	G16	Hexadecil	-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃	6,89
	G18	Octadecil	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	7,68

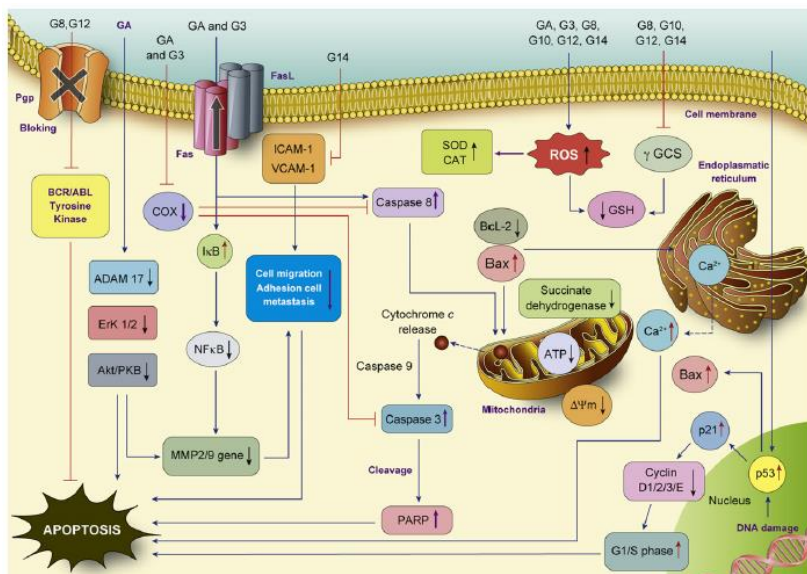
Com base nesses achados, nosso grupo iniciou o estudo da atividade antitumoral dos derivados do AG, focando maior interesse nos compostos que não estão disponíveis comercialmente. Os derivados ésteres do AG citados com cadeia alifática lateral contendo de 8 a 14 carbonos têm mostrado atividade antitumoral. Entretanto, esses compostos são solúveis somente em solventes orgânicos, o que prejudica a avaliação adequada do potencial antitumoral (LOCATELLI et al., 2008; LOCATELLI et al., 2009).

O AG e seus derivados mostraram não só as propriedades antitumorais, mas também a citotoxicidade seletiva para células tumorais em relação a várias linhagens não tumorais. Estes derivados ésteres demonstraram propriedades farmacológicas mais favoráveis, e em muitos casos, foram mais efetivos que o próprio AG. Por exemplo, os derivados sintéticos com oito ou mais átomos de carbono na cadeia lateral foram mais eficientes do que no AG em atividades antivirais, antifúngicas, antioxidantes e anticâncer (INOUE et al., 1995;

SERRANO et al., 1998; YOSHIOKA et al., 2000; GALATI; O'BRIEN, 2004; KAWADA et al., 2001; SALUCCI et al., 2002; LOCATELLI et al., 2008; CHEN et al., 2009; LOCATELLI et al., 2009; GIFTSON; JAYANTHI; NALINI, 2010; LOCATELLI et al., 2011).

Locatelli et al. (2013) apresentaram a IC₅₀ (Tabela 3) encontrada em diversos estudos avaliando a citotoxicidade do AG e alguns de seus derivados frente a varias linhagens celulares e os mecanismos de ação destes compostos (Figura 5).

Figura 5: Mecanismos de ação dos galatos. Locatelli e colaboradores apresentaram os prováveis alvos do AG e seus derivados nas células tumorais*.



*Todos os símbolos, siglas e abreviaturas apresentadas na figura estão descritos em suas listas apropriadas.

Fonte: LOCATELLI; MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013.

Tabela 3: Citotoxicidade do AG e seus derivados. IC₅₀ encontrada em diversos estudos que avaliaram a ação dos galatos frente à linhagens tumorais.

Galatos	Linhagem celular	IC ₅₀ (μM)
AG	HL60	300
	HL60RG	317
	dRLh-84	364
	PLC/PRF/5 HLE	387
	HUH-7	nd
	KB	nd
	P388-D1	282
	HeLa	358
	Calu-6	10-50
G3	HL60	nd*
	GM05757	nd*
	Wehi231	12
	L929	40
	HeLa	800
	THP-1	nd*
G8	Wehi 231	1.5
	L929	1
	B16-F10	45
	KB-C2	nd*
	L1210	22
	CEM	50
G10	B16-F10	82
	L1210	12.2
	CEM	9.8
G12	MCF7	nd*
	MCF7 ADR	nd*
	MDA-MB-231	1
	Wehi 231	1
	L929	1
	B16-F10	48
	HL60	33
	KB-C2	nd*
	L1210	10.9
	CEM	47.4
G14	B16-F10	60
	L1210	8.5
	CEM	>50

*nd – não determinado.

Fonte: Adaptado de LOCATELLI; MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013.

Estudos demonstram que o AG e os galatos tem a capacidade de gerar EROs e aumentar o Ca^{++} intracelular, ativando as caspases e liberando citocromo c, iniciando a apoptose (INOUE et al., 1995; SAKAGUCHI et al., 1998; ISUZUGAWA et al., 2001).

O AG e seus derivados podem exercer suas propriedades anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas através de efeitos sobre várias enzimas que participam do metabolismo neoplásico (OW; STUPANS, 2003). Outro mecanismo proposto para a indução de apoptose por AG é a relação entre a inibição da atividade de NF- κ B e a regulação negativa da via PI3K/AKT. Após a dissociação, o NF- κ B move-se para dentro do núcleo e promove a proliferação de células cancerosas, angiogênese e metástase (PARK et al., 2007).

Em relação à metástase, o AG pode reduzir a capacidade de invasão tumoral por meio da inibição da expressão de ADAM17, p-Erk, e p-Akt, através da regulação negativa das vias PI3K/AKT e RAS/MAPK (YU et al., 2011).

Chen e Chang (2012) demonstraram que o AG inibe a invasão celular e induz à diminuição na atividade e expressão de MMP-2 e MMP-9 em linhagens de leucemia humana K562 e KU812. Ainda, apresentaram que a *dowregulation* de MMP-2 e MMP-9 induzida pelo AG é mediada por degradação de Bcr/Abl e inativação de JNK1, respectivamente, em células K562.

Várias proteínas que estão envolvidas nas vias de sinalização de metástase e de reorganização do citoesqueleto, incluindo RAS, Cdc42, Rac1, RhoA, RhoB, PI3K e p38MAPK, também foram inibidas por GA (HO et al., 2010). O AG e o G3 diminuíram os níveis de ERK1/2, que são moléculas-chave na via de sinalização ERK, e de AKT/PKB, IKK, PKC e JNK (CHEN et al., 2011; LIAO et al., 2012).

O efeito inibidor da metástase do G14 parece estar associado com a capacidade deste galato em inibir a expressão de ICAM-1 e A VCAM-1 (LOCATELLI et al, 2011).

O AG, G8 e G12 induzem uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial, bem como um aumento da expressão do Bax e uma diminuição na expressão de Bcl-2. Este efeito inibidor de Bcl-2 por G8 e G12 é particularmente importante porque esta proteína está envolvida na resistência à apoptose (ROY et al., 2000; MEYSKENS et al., 2005; CORDOVA et al., 2011).

Calcabrini et al. (2006) mostraram que o G12 induz uma redução da sobrevivência e alterações no ciclo celular em linhagens de câncer de mama humano, MCF7, MCF7 ADR (multirresistentes) e MDA-MB-231 (mutante p53).

Em relação aos tumores sólidos de pele induzidos por DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno), foi demonstrado que o G12 não só preveniu a formação de tumores quimicamente induzidos na pele de ratos, como também foi capaz de induzir a morte seletiva das células tumorais em tumores estabelecidos (ORTEGA et al., 2003).

Nosso grupo deu continuidade aos estudos de Locatelli et al. (2008 e 2009), obtendo resultados importantes referentes aos efeitos antitumorais dos derivados do ácido gálico G8 e G12 em células B16-F10 nas pesquisas de Cordova e colaboradores (2011). Esses ésteres promoveram fragmentação do DNA e apresentaram efeito citotóxico e seletivo na linhagem de melanoma murino. Além disso, promoveram alterações na atividade lisossomal e na permeabilidade da membrana plasmática de forma mais significativa do que a interferência na atividade mitocondrial. Os mecanismos de citotoxicidade dos galatos avaliados relacionados às vias de apoptose envolveram ativação da caspase-3, indução de perda do potencial mitocondrial, aumento da expressão da Bax e inibição da expressão da Bcl-2 e não alteraram a expressão do receptor Fas. Em especial, o G12 promoveu geração de espécies reativas e inibição da atividade da catalase (CAT) e seu efeito citotóxico parece envolver a via de sinalização celular da AKT nas células B16-F10.

Diante do exposto, pode-se verificar que o G12 vem sendo bastante estudado como potencial agente antitumoral. No entanto, trata-se de um composto muito pouco solúvel em água e para evitar a adição de solvente orgânico em ensaios biológicos, procurou-se obter sais do G12, visando uma avaliação do potencial antitumoral mais adequada. Ainda, o fato dos compostos já estarem na forma de sal é muito importante, pois facilita a avaliação da ação dos compostos *in vivo*, inclusive através da administração por via oral. Assim, com este estudo pretende-se avaliar os efeitos citotóxicos e os mecanismos de ação antitumoral do G12 e os sais monossódico (GS12A), dissódico (GS12B) e trissódico (GS12C) em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), melanoma murino (B16-F10), melanoma humano (SK-mel-28) e câncer de mama humano (MDA-MB-231).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral e os mecanismos de citotoxicidade do galato de dodecila (G12) e dos sais monossódico (GS12A), dissódico (GS12B) e trissódico (GS12C) em linhagens celulares de leucemia, melanoma e câncer de mama.

3.2 Objetivos específicos

- a) Comparar o efeito citotóxico do galato de dodecila (G12) e dos sais monossódico (GS12A), dissódico (GS12B) e trissódico (GS12C) entre as linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), melanoma murino (B16-F10), melanoma humano (SK-mel-28), câncer de mama humano (MDA-MB-231), melanócito humano (NGM) e fibroblasto humano (MRC-5).
- b) Realizar análise de concentração-resposta da citotoxicidade do galato de dodecila e dos sais nas diferentes linhagens celulares;
- c) Analisar as possíveis alterações no ciclo celular frente ao tratamento com o G12 e os sais;
- d) Definir as linhagens mais sensíveis aos compostos testados;
- e) Verificar o tipo de morte celular causado pelos compostos nas linhagens celulares de leucemia L1210, e nas linhagens de melanoma B16-F10 e SK-mel-28;
- f) Avaliar a atividade da Caspase-3 em linhagem celular de L1210;
- g) Avaliar citotoxicidade do G12 e dos sais em relação à capacidade proliferativa e de formação de colônias nas linhagens B16-F10 e SK-mel-28;
- h) Definir o sal que apresenta maior citotoxicidade nas linhagens de melanoma;

- i) Verificar a possível inibição da migração e da invasão celular causada pelos compostos em linhagens de melanoma;
- j) Avaliar a atividade e a expressão gênica das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) das linhagens B16-F10 e SK-mel-28 na presença do G12 e dos sais;

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Os meios de cultura (DMEM, RPMI e HAM-F12), o soro fetal bovino (SFB), o soro fetal *calf serum* (CS), a penicilina e a estreptomicina foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO) e o álcool etílico foram adquiridos da Nuclear; o ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o carbonato de sódio (Na_2CO_3), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); a sacarose, o cloreto de magnésio (MgCl_2) e o Giemsa foram adquiridos da Merck® (Darmstadt, Alemanha); a anexina-V-FITC foi adquirida da BD; o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); a tripsina foi adquirida da Cultilab; azul de trypan, o triton-X 100, o iodeto de propídeo, a albumina bovina, o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a hidrocortisona, a triiodotreonina, a insulina, a transferrina, o fator de crescimento epidermal, o Tween 20, a campotecina, a agarose, o PMSF (Fluoreto de fenil metil metano sulfonil), o EGTA, a pepstatina, o SDS (dodecil sódio sulfato), o laranja de acridina, o brometo de etídeo, o Triton®, o CHAPS (Cholamidopropyl dimethylammonio 1-propanesulfonate hydrate), o azul de Cromassie brilhante, o DTT (1,4-Ditioeritritol) e os substratos para caspase-3 (Ac-DEVD-AMC) foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, EUA); a acrilamida e a bis-acrilamida foram obtidas da Ludwig Biotec (Porto Alegre, Rio Grande do Sul); o TRIS (HCl) foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil).

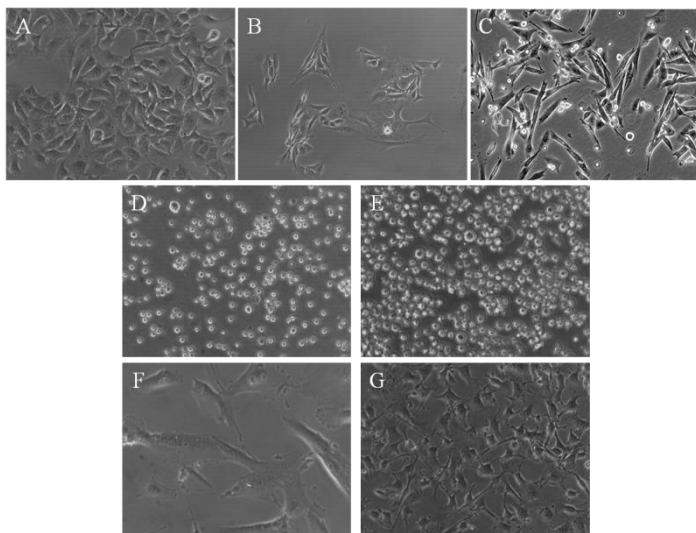
4.2 Compostos

O galato de dodecila (G12) foi fornecido pelo grupo do Professor Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os sais monossódico, dissódico e trissódico do G12 foram sintetizados pelo Professor José Agustín Pablo Quincoces Suárez, do Instituto da Saúde da Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN).

4.3 Cultura de Células

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), melanoma murino (B16-F10), melanoma humano (SK-mel-28), câncer de mama humano (MDA-MB-231), melanócito humano (NGM) e fibroblasto humano (MRC-5) (Figura 6).

Figura 6: Linhagens celulares: (A) B16-F10, (B) SK-mel-28, (C) MDA-MB-231, (D) L1210, (E) HL-60, (F) NGM e (G) MRC-5. 200x Nikon, Eclipse TS100.



As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio RPMI, DMEM ou HAM-F12 de acordo com as necessidades de cada linhagem celular. Os meios RPMI e DMEM foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7,4. O meio HAM-F12 foi utilizado para a cultura da linhagem NGM, em uma proporção 1:1 com DMEM (suplementado como descrito acima, mas sem SBF), suplementado com 20% de soro fetal *calf serum* (CS), 1,4 µM de hidrocortisona, 1 nM de triidrotrona (T_3), 10 µg/mL de

insulina, 10 µg/mL de transferrina e 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF). Todas as linhagens foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C e com 5% de CO₂.

As linhagens celulares L1210, HL-60, B16-F10, MDA-MB-231, NGM e MRC-5 foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro, estando disponíveis também no *American Type Culture Collection* (ATCC), USA. A linhagem de células de SK-mel-28 foi doada pela Dra. Ana Campa, da Universidade de São Paulo (USP).

Utilizou-se o método de Azul de Trypan (FRESHNEY, 1987) para verificação do número de células viáveis antes da realização de cada experimento. O número de células plaqueadas e o tempo de incubação foram adequados a cada experimento.

4.4 Tratamento Celular

O G12 foi dissolvido em DMSO e os sais foram dissolvidos em água destilada, sendo armazenados em alíquotas a -4°C. Para os sais, evitou-se ciclos de congelamento e descongelamento das alíquotas. De acordo com cada experimento, as soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas, sendo utilizados controles sem tratamento e com tratamento com DMSO (na mesma concentração utilizada na dissolução do G12).

O tempo de tratamento, o número de células e a placa utilizada (6, 12, 24 ou 96 poços) foram definidos de acordo com cada experimento realizado e as condições requeridas pelo mesmo.

4.5 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi verificada através da avaliação da integridade da membrana celular através da marcação com iodeto de propídeo (PI), utilizando-se um controle de células não marcadas. O PI é um corante que penetra na célula somente quando há comprometimento da membrana celular, ligando-se ao DNA e podendo ser quantificado por citometria de fluxo.

Para avaliação da viabilidade das células em suspensão (L1210 e HL-60) utilizaram-se 1x10⁶ células/poço, em placas de 24 poços para a incubação por 24 horas e de 1x10⁶ células/poço, em placas de 12 poços para a incubação por 48 horas. Já para as células aderidas (demais linhagens utilizadas neste trabalho), realizou-se somente a incubação por

48 horas, sendo utilizadas 3×10^5 células/poço, em placas de 6 poços. As linhagens de células tumorais foram tratadas em concentrações de 0 a 50 μM para o G12 e de 0 a 200 μM para os sais. Para as linhagens não tumorais, os tratamentos foram em concentrações de 0 a 50 μM do G12 e de 0 a 500 μM dos sais frente ao fibroblasto MRC-5, e nas concentrações de 0 a 500 μM do G12 e de 0 a 1000 μM dos sais para a verificação da integridade da membrana do melanócito NGM.

Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 500 μL de PBS. Em seguida, o PI 1 foi adicionado para a marcação. Após 5 minutos de incubação, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo FACS CANTO II, BD Biosciences.

Assim, avaliou-se a porcentagem de células viáveis (não marcadas com PI) e de células não viáveis (marcadas com PI), através do programa Flowing Software 2.5.0.

4.6 Concentração citotóxica (CC_{50})

Para determinar a concentração citotóxica, as células foram incubadas por 24 e/ou 48 horas com os compostos avaliados em concentrações crescentes, seguido da verificação da viabilidade celular. Assim, foi calculada a concentração que promoveu a citotoxicidade em 50% das células (CC_{50}).

4.7 Ciclo celular

Para analisar o ciclo celular foi utilizado PI, seguindo o método descrito por Yang et al. (2007). Essa análise permite avaliar o conteúdo de DNA de cada célula, podendo ser estimada a distribuição celular em cada fase do ciclo (WANG et al., 2009; WU; SUN; XUE, 2010).

Para este experimento, as células em suspensão (L1210) foram plaqueadas com densidade de 1×10^6 células/poço, em placas de 12 poços, enquanto que para as células aderentes (B16-F10 e SK-mel-28) a densidade foi de 4×10^5 células/poço, em placas de 6 poços. As células foram incubadas por 48 horas com os compostos nas concentrações de 10 e 50 μM do G12 e de 50, 100 e 200 μM de cada sal. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em etanol 70% gelado, seguido de incubação a -4°C por 30 minutos para fixação. Após esse período, uma alíquota de PBS + BSA a

2 % foi adicionada para inibir possíveis ligações inespecíficas com o PI. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em RNase 100 µg/mL além de 0,1% de Triton-X em PBS e em seguida marcadas com PI (1 mg/mL). A análise do DNA foi realizada por citometria de fluxo e a população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada usando os programas WinMID 2.9 e Flowing Software 2.5.0.

4.8 Coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (PI)

Na fase inicial da apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina do lado interno da membrana citoplasmática para a camada externa, tornando-se exposta na superfície extracelular (BEVERS; COMFURIUS; DEKKERS et al., 1999). A anexina V é uma proteína que se liga fortemente aos fosfolípidos de membrana, e tem alta afinidade pela fosfatidilserina, sendo um marcador de morte por apoptose. Porém, a externalização das fosfatidilserinas não é exclusiva da apoptose, ocorrendo também durante a necrose celular. A diferença entre estes dois tipos de morte é que, durante os estágios iniciais da apoptose, a membrana celular permanece intacta. Por conta disso, utiliza-se também o PI, que só entra na célula quando ocorre perda da integridade de membrana, sendo assim um indicativo de apoptose tardia ou morte celular por necrose (LIAO et al., 2010).

Assim, o tipo e o estágio da morte celular foram avaliados por citometria de fluxo após coloração das células com anexina-V-FITC e PI, com a utilização do kit ApopNexin™ FITC® (Millipore), em tempos de incubação de 24 e 48 horas. Para a incubação por 24 horas em placas de 12 poços foram utilizadas 1×10^6 células/poço e 4×10^5 células/poço para as linhagens de células em suspensão e aderentes, respectivamente. Para o período de incubação de 48 horas, foram utilizadas 4×10^5 células/poço (placas de 12 poços) para as linhagens suspensas, enquanto que para as células aderentes a densidade foi de $2,5 \times 10^5$ células/poço (placas de 6 poços). As concentrações de tratamento utilizadas para ambos tempos de incubação foram de 10 e 50 µM do G12 e de 50 e 100 µM de cada sal. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado. O PBS foi removido e as células foram ressuspensas em tampão de ligação (1x) e incubadas por 15 min a 4°C com Anexina-V-FITC para a marcação. O PI foi adicionado somente na hora da leitura em citômetro de fluxo. A população de células viáveis,

em apoptose, em necrose e/ou apoptose tardia foi analisada utilizando o programa Flowing Software 2.5.0.

4.9 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio

Através da marcação das células com laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina) e brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-phenilfenantridinio), podem ser observadas características da morte celular por apoptose. A observação das alterações morfológicas nucleares foi realizada utilizando microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100) (LEITE, et al, 1999). A apoptose é uma morte celular programada, na qual a célula reorganiza o citoesqueleto, diminui de tamanho e produz corpos apoptóticos (FINK; COOKSON, 2005). Os corpos apoptóticos apresentam-se corados de verde, sendo que os mesmos podem ser corados de vermelho quando as células estão em apoptose tardia. A morte celular por necrose caracteriza-se por manutenção da estrutura nuclear normal, sendo coradas de laranja. As células viáveis mantêm as características morfológicas preservadas e são coradas de verde.

Para a verificação do tipo de morte celular por esta metodologia, foram utilizadas 1×10^6 células/poço, em placas de 12 poços. As células foram tratadas por 24 horas com o G12 e os sais nas concentrações de 10 e 100 μM , respectivamente. Como grupo controle, foram utilizadas células sem tratamento plaqueadas nas mesmas condições de densidade e tempo. Após o período de incubação, o meio foi substituído por tampão PBS e uma solução contendo laranja de acridina (1,2 $\mu\text{g/mL}$) e brometo de etídeo (4 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada. Em seguida o PBS foi removido. As células foram observadas em microscópio de fluorescência.

4.10 Avaliação da atividade das caspase 3

Independente da sinalização ativada, o processo final que resulta na morte celular por apoptose é comum, e envolve a ativação da cascata de caspases. As caspases podem ser iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) ou efetoras (caspases-3, -6 e -7), que clivam substratos específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2005). A

atividade da caspase-3 foi monitorada pela produção de substrato fluorescente, segundo protocolo do fabricante (SIGMA-ALDRICH).

Para avaliação da atividade da caspase-3, 3×10^6 células foram incubadas com o G12 e os sais em concentrações de 10 e 100 μM , respectivamente, por 4 horas. Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e lisadas por 15 minutos (4°C) com 100 μL de tampão de lise contendo HEPES 10 mM (pH 7.4), KCl 42 mM, MgCl_2 5 mM, PMSF 1 mM, EDTA 100 μM , EGTA 100 μM , pepstatina A 1 $\mu\text{g/mL}$, leupeptina 1 $\mu\text{g/mL}$, aprotinina 5 $\mu\text{g/mL}$, CHAPS 0,5% e DTT 1 mM. Após, o lisado foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , sendo utilizado o sobrenadante. Posteriormente, 50 μL deste lisado celular foi adicionado a 150 μL de uma solução do meio de reação contendo HEPES 25 mM (pH 7.4), CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM e substrato. Foram utilizados 20 μM do substrato fluorogênico para caspase-3, o Ac-DEVD-AMC (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina). Após incubação por 120 minutos a 37°C , a atividade da caspase-3 foi avaliada através da produção do AMC fluorescente. A fluorescência foi monitorada em fluorímetro (Perkin-Elmer LS55, Boston, MA, USA), utilizando o comprimento de onda de 380 nm para excitação e 465 nm para emissão. Os resultados foram expressos em porcentagem com base nas unidades de fluorescência obtidas após correção pela concentração de proteína presente em cada amostra.

4.11 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico, diferente dos testes de viabilidade que mensuram um efeito biológico específico, baseia-se na capacidade de uma única célula crescer e se tornar uma colônia, possibilitando a detecção da morte celular reprodutiva, um efeito biológico mais amplo (FRANKEN, et al., 2006).

Para a realização do experimento foram utilizadas 300 células/poço, em placas de 6 poços. As células foram tratadas com concentrações de 0,5 e 1,0 μM do G12 e de 30 μM dos sais durante 7 dias. Após esse período, o meio foi retirado dos poços e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente, adicionou-se uma solução de formalina 10%, por 15 minutos, seguida da adição do corante Giemsa. As células foram lavadas com H_2O para retirada do excesso de corante. Após o período de secagem (24 horas), o número de colônias foi

avaliado e representado em porcentagem em relação ao controle com células não tratadas.

4.12 Migração celular (*Scratch Assay*)

A migração celular é um processo essencial para o desenvolvimento, mas pode contribuir para patologias importantes. Uma célula ou grupo de células migra de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico (HORWITZ; WEBB; ZHANG, 2004). Durante a metástase tumoral, as células migram do tumor primário para o sistema circulatório e, em seguida, para outro local (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996).

O método *Scratch assay* mimetiza a migração celular *in vivo* e baseia-se na observação de que a criação de um espaço artificial em uma cultura celular em monocamada confluyente irá promover a migração das células presentes na borda deste espaço em direção ao mesmo, a fim de fechá-lo (LIANG et al., 2007). Para avaliar a ação dos compostos sobre a capacidade de migração celular, foram plaqueadas 3×10^5 células/poço (placa de 12 poços). Após 24 horas, um “risco” foi feito sob a camada celular com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L. O meio foi retirado e foi adicionado meio suplementado ou não com SFB, a fim de observar a influência do SFB na migração celular. As células foram tratadas com concentrações de 5 e 50 μ M do G12 e do sal monossódico (GS12A), respectivamente. As células foram fotografadas no momento do tratamento (tempo zero) e após 24 e 48 horas de tratamento em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). As fotos foram analisadas através do programa ImageJ®, sendo verificada a distância de um lado a outro da fenda em pixels. A migração celular foi avaliada em porcentagem em relação ao controle não tratado em cada tempo de incubação.

4.13 Invasão celular

A capacidade das células malignas destruírem a membrana basal e os demais componentes da MEC tem sido relacionada ao potencial invasivo destas neoplasias (JUHÁSZ, 2000).

O experimento foi realizado utilizando insertes (Millicell® Cell Culture Insertes) e matrigel (Corning® Matrigel® Matrix). Esse sistema é composto por uma placa de cultura de 24 poços e insertes com

membrana de PET (politereftalato de etileno) com microporos. O sistema cria dois ambientes diferentes, possibilitando a passagem voluntária das células de um lado para outro da membrana, já que o diâmetro dos poros é maior que o das células tumorais. A membrana é coberta por uma fina camada de Matrigel, mimetizando a MEC, que obstrui os poros, impedindo que células não invasivas atravessem a membrana. Assim, é possível verificar as propriedades invasivas de células tumorais *in vitro*, pois elas invadem a camada de Matrigel e atravessam os poros da membrana. Após fixação e coloração é possível visualizar as células invasivas por microscopia (ALBERTS et al., 2004).

Antes de iniciar o ensaio todos os materiais utilizados para a manipulação do matrigel foram colocados em temperatura de -20°C . Os insertes foram colocados dentro dos poços da placa e lavados com DMEM gelado. Foram adicionados 60 μL de matrigel diluído 1:10 em meio DMEM sem soro gelado em cada *insert* utilizado. A placa com os insertes foi incubada à 37°C durante 1 hora para a polimerização do matrigel. Após esse período, 6×10^4 células foram colocadas sobre o matrigel em um volume final de 200 μL de DMEM + 10% SFB. Embaixo do *insert* (no poço da placa), foram adicionados 300 μL de DMEM + 10% SFB. As células foram tratadas com concentrações de 2,5 e 5 μM do G12 e de 50 e 75 μM do GS12A. Os tratamentos foram colocados dentro do *insert*, sendo que a concentração do composto foi calculada considerando o volume final de 500 μL . O controle não recebeu nenhum tipo de tratamento ou estímulo. A placa foi incubada por 48 horas a 37°C .

Após o período de tratamento, as células foram coradas. Para isso, o meio foi retirado do poço e neste foi adicionado glutaraldeído 5% por 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com H_2O destilada, adicionado toluidina blue 0,5% e incubadas por 15 minutos. Novamente, as células foram lavadas com H_2O destilada. O meio de dentro do *insert* foi retirado e o matrigel foi retirado. Os insertes foram observados em microscópio. Ao microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100), foram fotografados 10 campos de cada *insert* e o número de células foi contado através do programa ImageJ, sendo avaliada a invasão celular pela porcentagem da média do número de células por campo em relação ao controle não tratado.

4.14 Atividade de metaloproteínases – Ensaio de zimografia

O ensaio de zimografia, realizado de acordo com KLEINER et al. (1994), possibilita avaliar a atividade e identificar as metaloproteínases (MMPs) em amostras biológicas. Cada tipo de MMP degrada um substrato específico da matriz extracelular e possui um peso molecular diferente, sendo divididas em subgrupos. Ao grupo das gelatinases, pertencem as MMP-2 e MMP-9, que tem como substrato principal a gelatina. Assim, após a revelação do gel, as bandas claras mostram que ocorreu degradação do substrato pela enzima, e onde não há bandas ou há diminuição da intensidade das mesmas, refere-se à inativação enzimática (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005).

Para a realização deste ensaio as células foram semeadas com densidade de 5×10^4 células/poço, em placas de 24 poços. As células foram incubadas por 48 horas com os compostos nas concentrações de 0,5 μM de G12 e 50 e 75 μM de GS12A. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado para a avaliação da atividade da MMP-2 e MMP-9. O volume de sobrenadante utilizado foi equivalente a 30 μg de proteína. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (Lowry, 1951). A amostra foi submetida à eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE 30% com 0,5% de gelatina, como substrato para as MMPs. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com H_2O destilada e, em seguida, foi lavado duas vezes com Triton® 2,5% por 15 minutos cada, para remoção do SDS. O gel foi lavado novamente com H_2O destilada e incubado com tampão de incubação (Tris-HCl 0,05M/ CaCl_2 10 mM/ ZnCl_2 1 μM – pH 8,0) por 18 horas em banho-maria a 60°C. Após o período de incubação, o gel foi lavado 3 vezes com H_2O destilada. Posteriormente, o gel foi corado com solução de Comassie Blue 0,5% por 30 minutos. Para facilitar a visualização das bandas, o gel foi lavado 3 vezes com solução de descoloração (metanol, ácido acético e água). O gel foi escaneado em equipamento de fotodocumentação Chemidoc MP (BioRad). As imagens foram analisadas e as bandas quantificadas em pixels através do programa ImageJ. A atividade proteolítica foi visualizada como bandas claras, em contraste com o fundo azul da gelatina marcada com o corante e os resultados foram expressos em porcentagem de atividade das MMP-2 e MMP-9 em relação ao controle não tratado. Assim, a avaliação das bandas presentes no gel indica a inibição ou não das proteínas analisadas.

4.15 Expressão de metaloproteínases

Para avaliação da expressão da MMP-2 e MMP-9, foram semeadas 5×10^5 células/poço, em placas de 6 poços (foram utilizadas células de dois poços para cada amostra). As células foram incubadas por 16 horas com tratamento com os compostos nas concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0 μM do G12 e 25 e 50 μM do GS12A. Após o período de tratamento, foi realizada a extração do RNA das células e a síntese do DNA complementar (cDNA) das amostras para avaliação da expressão das MMPs por PCR em tempo real (qPCR).

4.15.1 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA total das células foi realizada pelo método do Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a 260 nm e a pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm.

Para a reação da transcriptase reversa (RT), as amostras de RNA (2 μg) foram tratadas com DNase e tampão DNase e incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado EDTA 25 mM seguido de um tempo de incubação de 10 minutos a 65°C. Foi adicionado RT Master Mix (10x RT Buffer, 25x dNTP Mix 100 mM, 10x RT Random Primers, Multi Scribe™ Reserve Transcriptase e H₂O livre de RNA). A reação foi incubada em ciclos de tempo e temperatura: 25°C por 10 minutos; 37°C por 60 minutos; 37°C por 60 minutos; 85°C por 5 minutos; 4°C, ∞ 99 minutos e 9 segundos. Todas as incubações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR Systems, Applied Biosystems). A amostra de cDNA foi armazenada a -20°C.

4.15.2 Reações em cadeia da Polimerase (PCR)

A expressão gênica da MMP-2 e da MMP-9 foi avaliada e quantificada por meio do método de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o GAPDH como controle endógeno. As sequências sense (F, *foward*) e antisense (R, *reverse*) dos *primers* utilizados, de acordo com as linhagens celulares avaliadas, foram as seguintes:

- GAPDH murino: 5'-GTGTCCGTCGTGGATCTGAC3-' (F); 5'-GGAGACAACCTGGTCCCTCAG3-' (R).
- MMP-2 murino: 5'-TTCCCTAAAGCTCATCGCAGACT-3' (F); 5'-TCCAAACTTCACGCTCTTGAGA-3' (R).
- MMP-9 murino: 5'-TCCTACTCTGCCTGCACCATAAAG-3' (F); 5'-CTGTACCCTTGGTCTGGACAGAAAC-3' (R).

Os *primers* de GAPDH foram adquiridos da Gibco Invitrogen® e os *primers* das MMPs foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH®.

Antes da qPCR, foi realizada uma PCR qualitativa, a fim de verificar a temperatura ideal de amplificação para cada *primer*, sendo utilizado o kit PCR 2x Master Mix (Fermentas) e as amostras controle. Para cada amostra foi adicionado o Master Mix (TaqDNA polimerase, nucleotídeos específicos e MgCl), o par de *primers* e H₂O, totalizando um volume final de 15 µL. A reação foi incubada em termociclador (GeneAmp PCR Systems, Applied Biosystems), com os seguintes ciclos de temperatura:

- 5 minutos a 94°C;
- 35x: 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55, 57, 60,6 ou 65°C (temperatura a ser testada); 30 segundos a 72°C.
- 5 minutos a 72°C;
- ∞ a 4°C.

Após a incubação as amostras foram transferidas para um gel de agarose 1%, sendo utilizado tampão TAE 1%. Ao final da corrida foi verificado que a melhor temperatura de amplificação, ou seja, a banda que melhor pode ser visualizada de todos os *primers* foi a das amostras que foram incubadas a 60,6°C na temperatura teste.

Para a qPCR, os cDNAs foram diluídos na proporção 1:5. As reações foram realizadas em volume final de 15 µL, contendo 0,9 µL da mistura de pares de *primers* (*forward e reverse*) de cada gene (concentração final de 0,15 µM de cada *primer*), 5 µL de cDNA, 7,5 µL de Reagente Power SYBR-Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 1,6 µL de H₂O.

O ensaio de qPCR foi realizado em termociclador ABI 7900HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems® - Life Technologies), nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e elongação dos *primers* a 60,6°C por 1 minuto. Para todos os experimentos, o *threshold* foi determinado automaticamente pelo software SDS versão 2.4.

4.16 Análise estatística

Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes em dias diferentes. Foram elaboradas planilhas de dados utilizando o programa Microsoft Excel 2010, para os cálculos de média, erro-padrão da média (EPM) e porcentagem. Os resultados de CC_{50} foram expressos como a média \pm EPM. Para a avaliação estatística foi utilizado o programa GraphPad Prisma® Versão 5.00, sendo utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e/ou análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni, ambos para realizar as comparações fixando um grupo controle. As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade foi menor que 0,05 ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade

Embora muitas pesquisas sejam realizadas em busca de novas alternativas terapêuticas para o câncer, depara-se frequentemente com o problema do desenvolvimento de resistência aos tratamentos. As células tumorais adquirem resistência aos mecanismos de morte rapidamente e grande parte das moléculas utilizadas causa toxicidade *in vivo*, não apresentando a seletividade adequada. Nesse contexto, compostos naturais e derivados vem sendo estudados no sentido de garantir o desenvolvimento de novos fármacos (CHAKRABARTIL et al., 2012; JONES; KATIYAR, 2013).

Entre os derivados dos compostos naturais, nosso grupo começou um estudo avaliando a atividade do AG e seus derivados n-alkil ésteres frente a diversas linhagens celulares tumorais, dando ênfase às pesquisas com o G8 e o G12 (LOCATELLI et al., 2008; LOCATELLI et al., 2009; CORDOVAI et al., 2011).

Análises *in vitro* e *in vivo* mostram a atividade dos alkil ésteres em tipos severos de câncer, incluindo leucemias, melanoma, câncer de pulmão e de mama (LOCATELLI; MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

Levando em consideração os resultados que o G12 vem apresentando, principalmente quanto à seletividade, e para melhorar a solubilidade do composto, foram sintetizados três sais deste composto. A citotoxicidade dos sais monossódico (GS12A), dissódico (GS12B) e trissódico (GS12C), em comparação com a atividade do G12, foram testadas no presente trabalho.

Inicialmente, foi realizada uma avaliação da citotoxicidade do G12 e os sais em linhagens de leucemia murina (L1210) e humana (HL-60). A CC_{50} foi determinada por curvas de concentração e resposta em tratamentos de 24 horas com o G12 e os sais.

Os sais apresentaram uma citotoxicidade muito baixa em relação ao G12 (Tabela 4). GS12A, GS12B e GS12C apresentaram CC_{50} maiores que 400 μ M, enquanto o precursor, menor que 14 μ M.

Tabela 4: Determinação de CC_{50} do G12 e os sais em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210) e leucemia promielocítica aguda humana (HL-60) com tratamento de 24 horas.

	CC_{50} (μ M)* – 24 horas			
	G12	GS12A	GS12B	GS12C
L1210	13,1 \pm 0,7	429,56 \pm 19,9	485,3 \pm 21,5	612,3 \pm 33,7
HL-60	47,9 \pm 5,2	> 1000,0	594,3 \pm 28,8	990,8 \pm 37,9

* Dados expressos em média \pm EPM (n = 3).

Devido a estes resultados, a citotoxicidade e a seletividade dos compostos foi avaliada nas mesmas concentrações para as linhagens tumorais L1210, HL-60, B16-F10, SK-mel-28 e MDA-MB-231, com um tempo de incubação maior, de 48 horas.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que, tanto o G12 quanto os sais, tem maior efeito sobre as linhagens tumorais nesse tempo de tratamento. Os resultados mostram a citotoxicidade do G12 frente às linhagens L1210, B16-F10 e SK-mel-28, apresentando CC_{50} de 5,4, 3,5 e 2,5 μ M, respectivamente. Os sais também apresentaram menores CC_{50} nestas mesmas linhagens, entre 100 e 200 μ M destacando uma maior atividade do GS12A. Ainda, os compostos apresentaram seletividade para as células tumorais, apresentando menor citotoxicidade para o fibroblasto MRC-5 e o melanócito NGM.

Tabela 5: Citotoxicidade do G12 e os sais frente a um painel de células tumorais e duas linhagens não tumorais. CC_{50} em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210), leucemia promielocítica aguda humana (HL-60), melanoma murino (B16-F10), melanoma humano (SK-mel-28), câncer de mama humano (MDA-MB-231), melanócito humano (NGM) e fibroblasto humano (MRC-5) com tratamento de 48 horas.

	CC_{50} (μ M)* – 48 horas			
	G12	GS12A	GS12B	GS12C
L1210	5,4 \pm 0,3	129,4 \pm 16,3	181,9 \pm 24,2	163,3 \pm 23,5
HL-60	38,1 \pm 2,5	453,9 \pm 37,3	354,8 \pm 30,5	274,8 \pm 29,3
B16-F10	3,5 \pm 0,2	108,4 \pm 9,7	130,6 \pm 12,1	132,1 \pm 15,8
SK-mel-28	2,5 \pm 0,1	130,3 \pm 17,7	186,6 \pm 28,2	196,8 \pm 20,6
MDA-MD-231	31,0 \pm 2,7	151,7 \pm 20,2	148,2 \pm 19,7	164,4 \pm 23,9
MRC-5	> 50,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
NGM	> 500,0	> 1000,0	> 1000,0	> 1000,0

* Dados expressos em média \pm EPM (n = 3).

O efeito citotóxico do G12 já foi descrito frente a diferentes linhagens tumorais (LOCATELLI; MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013). Sugere-se que a diferença encontrada entre os valores de CC_{50} e os tempos de tratamento ideais dos galatos pode estar relacionada à diferença da lipofilicidade dos compostos.

A lipofilicidade é um fator importante a ser considerado na avaliação da atividade citotóxica de derivados do AG, uma vez que conduz a uma maior afinidade para o interior da bicamada lipídica, influenciando assim a entrada do composto na célula (FUJITA; KUBO, 2001; FIUZA et al., 2004).

O efeito antiproliferativo dos derivados fenólicos depende da taxa de incorporação nas células. Essas propriedades são afetadas pela presença de grupos hidroxila no anel e pelo tamanho dos substituintes da porção éster. Quanto maior a cadeia lateral, mais hidrofóbico o composto será. Assim, o conhecimento das características estruturais desses compostos é de grande importância para a compreensão das relações estrutura-atividade (FIUZA et al., 2004).

Considerando que o Log P é uma propriedade físico-química relacionada à hidrofobicidade da molécula, o G12 (Log P = 5,3) apresenta capacidade de interagir com a membrana lipídica (WANG, 2001; LEAL et al, 2009).

Nesse sentido, estudos vêm investigando a capacidade dos galatos em entrar nas células ou interagir com as membranas lipídicas. Kubo et al. (2002) sugeriu que o grupo dodecil do G12 permite a partição do composto nas membranas lipofílicas das células e organelas, em comparação com o AG, que não apresenta a cadeia lateral hidrofóbica. Ainda, foi proposta uma relação entre a ligação do grupo pirogalol (anel fenólico trihidroxilado) com a porção hidrofílica da superfície da membrana e a interferência da porção alquila nas superfícies hidrofóbicas interiores da membrana (HSU; CHANG; CHANG, 2007).

Nossos estudos corroboram com os resultados de Leal e colaboradores (2009), que demonstraram que uma maior atividade antifúngica dos galatos não estava diretamente relacionada a uma maior lipossolubilidade, mas que deve haver um equilíbrio entre essas características.

Como a síntese dos sais testados é passível de patente, detalhes quanto a este processo não serão apresentados. Entretanto pode se dizer que o número de íons sódio adicionados está relacionado com uma maior hidrossolubilidade. Comparando os três sais sintetizados, monossódico, dissódico e trissódico, e levando em consideração a busca

de um equilíbrio entre as características hidro e lipossolúveis, sugere-se que o sal GS12A (monossódico) apresente maior citotoxicidade frente às linhagens testadas (com exceção da HL-60), o que foi observado na avaliação da viabilidade celular (Tabelas 1 e 2). Ainda, a necessidade de um período de tempo maior para uma atividade mais acentuada dos sais também pode estar relacionada às respectivas estruturas químicas.

Entre as linhagens testadas, a HL-60 foi a mais resistente frente à ação dos compostos estudados, apresentando CC_{50} de 38 μ M para o G12 e maior que 274 μ M para os sais. Em comparação a estes resultados, Chen e colaboradores (2011) verificaram a indução de apoptose em células THP-1, enquanto que isso não foi verificado em células HL-60 e Jurkat.

A maior resistência da linhagem leucêmica HL-60 frente aos galatos pode estar relacionado ao gene p53. Sabe-se que um dos mecanismos de ação destes compostos na indução da morte celular está diretamente relacionado a um aumento na regulação deste gene (LOCATELLI et al., 2013) e considerando que as células HL-60 possuem o gene p53 significativamente alterado ou inexistente (ROTTER, 1985), a resposta ao tratamento com os galatos não é a mesma, como pode ser verificado em nossos resultados (Tabelas 4 e 5).

Levando em consideração os resultados obtidos inicialmente, decidiu-se dar continuidade ao presente estudo com as linhagens de L1210, B16-F10 e SK-mel-28.

O entendimento do mecanismo de morte celular envolvido no efeito biológico dos compostos analisados é importante no estudo e desenvolvimento de novos medicamentos antitumorais. Cabe ressaltar que na literatura não são descritos estudos com sais do G12. Ainda, não existem referências sobre a ação do G12 em linhagem de melanoma humano SK-mel-28.

Considerando que um dos principais objetivos na síntese dos sais do G12 é sua avaliação posterior em testes *in vivo* e que os modelos atualmente disponíveis em nosso laboratório para tais estudos são com linhagens tumorais de melanoma, optou-se por não dar continuidade aos estudos com a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 neste momento.

Na análise do ciclo celular (Figura 7 e Apêndice A), é possível verificar que os compostos induzem à fragmentação do DNA, não alterando ou bloqueando as fases do ciclo, em linhagens tumorais de leucemia (L1210) e melanoma (B16-F10 e SK-mel-28) nas concentrações de 10 e 50 μ M para o G12 e 50, 100 e 200 μ M para os sais. Ainda, pode-se observar que os danos causados ao DNA são

dependentes da concentração, pois o número de células com fragmentação do DNA aumenta de acordo com o aumento da concentração usada na incubação das células. Esses resultados corroboram com a determinação da CC_{50} , mostrando que o aumento de morte celular é proporcional a concentração dos compostos e que a citotoxicidade dos compostos avaliados pode induzir à apoptose.

A capacidade de proliferação celular e formação de colônias das linhagens B16-F10 e SK-mel-28 foi avaliada através do ensaio clonogênico, utilizando-se concentrações subtóxicas dos compostos. As concentrações utilizadas foram baseadas no ensaio de citotoxicidade, levando em consideração que o ensaio exige a utilização de uma concentração bem abaixo da CC_{50} , devido ao número pequeno de células utilizadas.

Os resultados estão apresentados na Figura 8 e mostram que o G12 em concentrações de 0,5 e 1,0 μ M inibiu a proliferação celular em 53 e 90%, respectivamente, em ambas as linhagens. Entre os sais, destaca-se o efeito antiproliferativo do GS12A frente à linhagem B16-F10, com inibição de 77% da capacidade de formação de colônias. Na linhagem Sk-mel-28, todos os sais promoveram uma inibição de aproximadamente 30%.

Assim como nos resultados encontrados, o AG e seus derivados tem sido relatados como agentes seletivos na indução de apoptose em células tumorais em relação à linhagens não tumorais (INOUE, et al., 2000) e na inibição da proliferação de células tumorais metastáticas (OHNO; INOUE; OGIHARA, 2001).

Utilizando o ensaio de coloração com cristal violeta, como utilizado na avaliação da proliferação celular em nosso estudo, Cao e colaboradores (2014) mostraram que após 48 horas de tratamento com a quercetina, a viabilidade das células B16-F10 diminuiu de uma forma dependente da concentração.

Figura 7: Ciclo celular de L1210 (A), B16-F10 (B) e SK-mel-28 (C) após 48 horas de tratamento com G12 (10 e/ou 50 μ M) e os sais (50, 100 e 200 μ M). Os resultados estão expressos em percentual. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, n = 3.

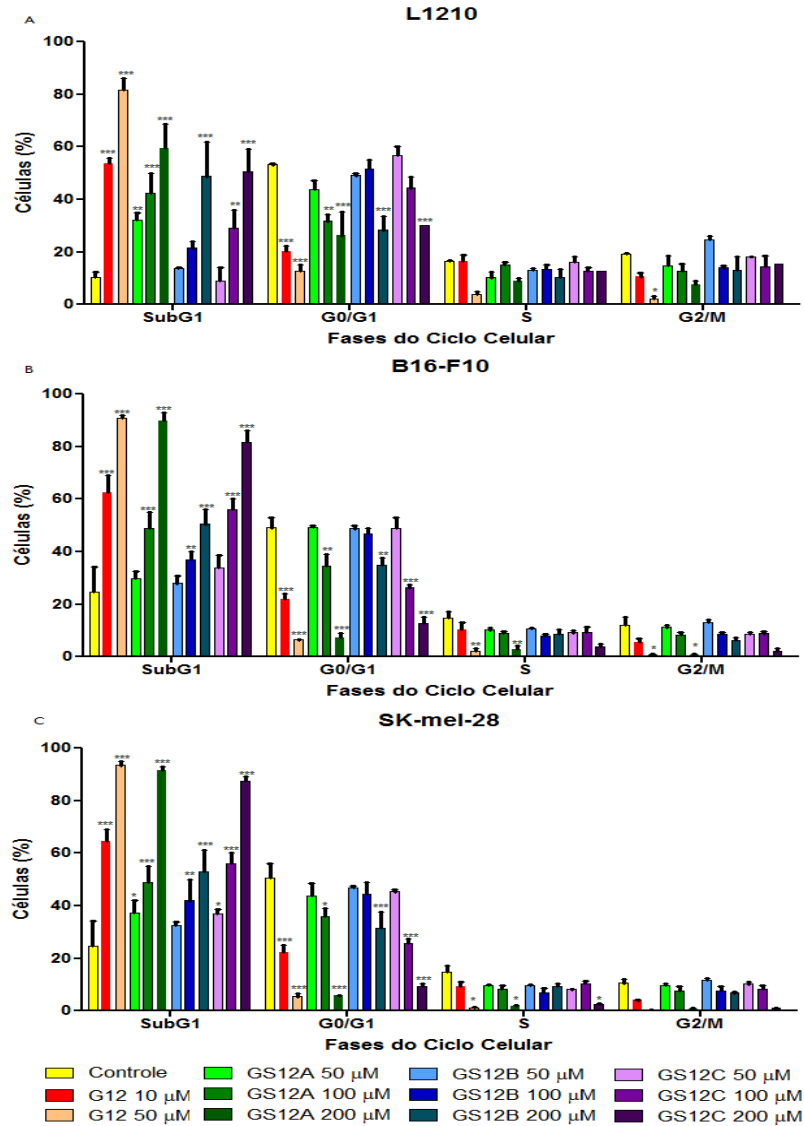
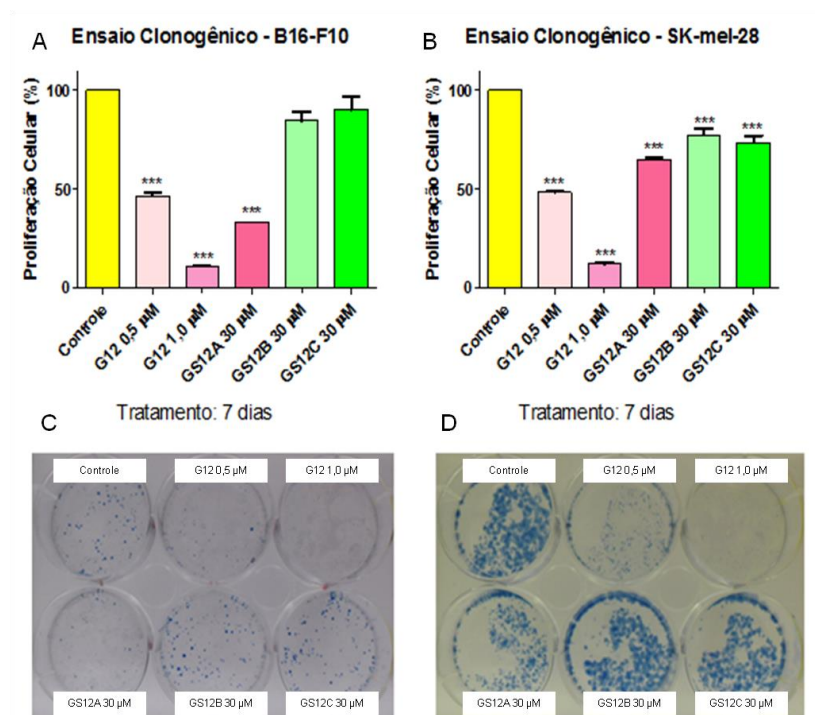


Figura 8: Inibição da formação de colônias em linhagens celulares de melanoma, B16-F10 e SK-mel-28, após 7 dias de tratamento com G12 (0,5 e 1,0 μM) e os sais (30 μM). **A e B:** Análise quantitativa da formação de colônias. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle sem tratamento. **C e D:** Imagens representativas da formação de colônias. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$.



5.2 Tipo de morte celular

Embora existam diferentes tipos de morte celular, uma das bases para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas está direcionada na indução da morte de células tumorais por apoptose (ISUZUGAWA; INOUE; OGIHARA, 2001; GRIMM et al., 2011; GALLUZI et al., 2012).

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos galatos, realizou-se uma avaliação por citometria de fluxo, por meio da marcação com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo.

Nos gráficos de pontos, pelos quais os resultados são apresentados, pode-se verificar o “caminho” do mecanismo de morte celular por apoptose, ou seja, a migração das células do quadrante inferior direito (células viáveis) para o quadrante inferior esquerdo (células em apoptose) e, posteriormente ou concomitantemente, para o quadrante superior direito (apoptose tardia).

Essa análise é possível, pois a translocação da fosfatidilserina para a camada externa da membrana citoplasmática acontece no início do processo de morte celular por apoptose. Assim, a conjugação do marcador anexina-V-FITC à fosfatidilserina se dá em tempos ou concentrações menores, dependendo do composto testado. Em estágios mais avançados da apoptose, pode ocorrer uma dupla marcação das células, com conjugação de iodeto de propídeo ao DNA. Nesse caso, sugere-se indução à apoptose tardia, estágio da morte celular em que há rompimento da membrana celular ou formação de poros, permitindo a permeação do PI (BEVERS; COMFURIUS; DEKKERS et al., 1999; LIAO et al., 2010).

Assim, a avaliação do tipo de morte celular por essa metodologia foi realizada em condições com diferentes concentrações e tempos de tratamento, para melhor elucidação do mecanismo envolvido na morte celular induzida pelo G12 e os sais.

Em todas as linhagens testadas, L1210 (Figura 9), B16-F10 (Figura 10) e SK-mel-28 (Figura 11), os resultados sugerem que a ação do G12 e dos sais resulta em apoptose ou apoptose tardia, dependendo do tempo de incubação e da concentração do composto. O percentual de células em cada quadrante, em cada condição de tratamento, está apresentado em tabelas no Apêndice B.

Esses resultados corroboram diretamente com a avaliação da citotoxicidade e do ciclo celular: quanto maior o tempo de incubação das células com os compostos, maior a ação dos compostos; e quanto maior a concentração do composto utilizado na incubação, maior a porcentagem de células mortas. Ainda, todos os resultados apresentados até aqui demonstram uma maior atividade do G12 em relação aos sais, tanto em relação ao tempo de incubação necessário, quanto a concentração necessária para ação frente às linhagens tumorais avaliadas.

Ainda, a morte celular por apoptose causada pelo G12 e os sais verificada em nossos experimentos também é descrita em estudos com o

AG e seus derivados ésteres em diversas linhagens celulares, incluindo leucemias e melanoma. Locatelli e colaboradores (2013) citaram a ação do G12 através de diferentes mecanismos de ação em linhagens tumorais como MCF7, MDA-MB-231, Wehi 231, L929, B16-F10, HL-60, L1210 e CEM.

Figura 9: Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células L1210 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e os sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo e a localização no gráfico corresponde ao tipo de morte celular: apoptose (quadrante inferior direito), necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia/dupla marcação (quadrante superior direito), viáveis (quadrante inferior esquerdo).

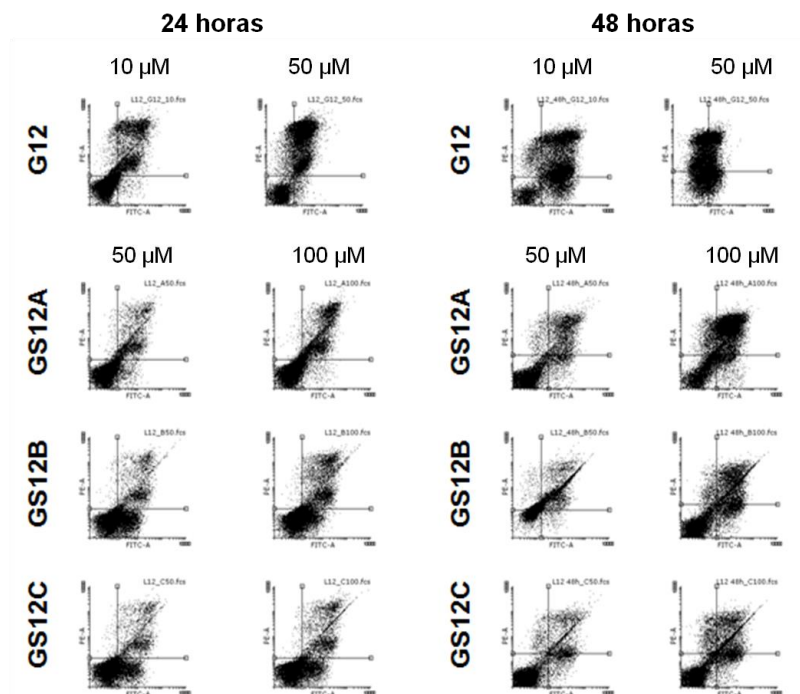


Figura 10: Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células B16-F10 tratadas com G12 (10 e 50 μ M) e os sais (50 e 100 μ M) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo e a localização no gráfico corresponde ao tipo de morte celular: apoptose (quadrante inferior direito), necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia/dupla marcação (quadrante superior direito), viáveis (quadrante inferior esquerdo).

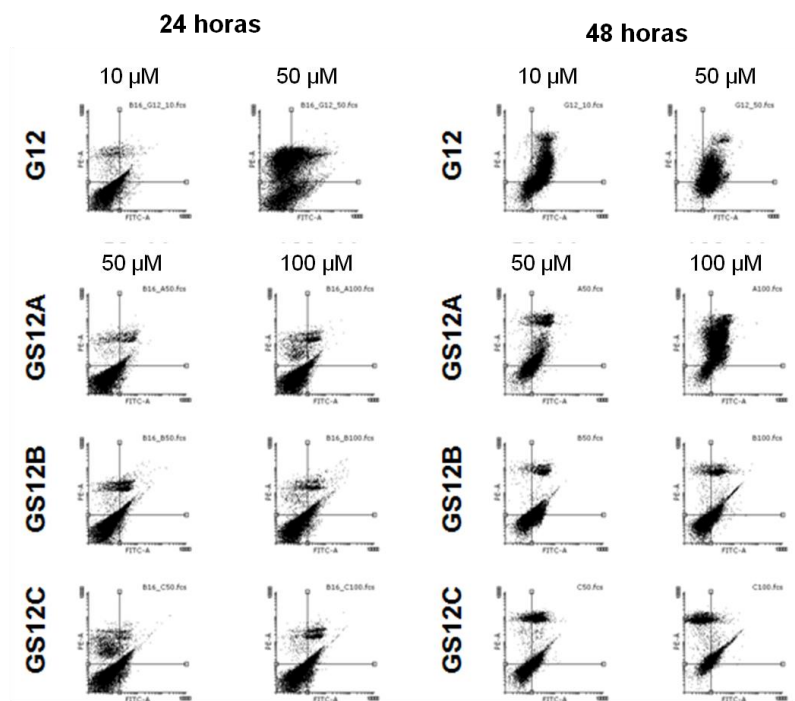
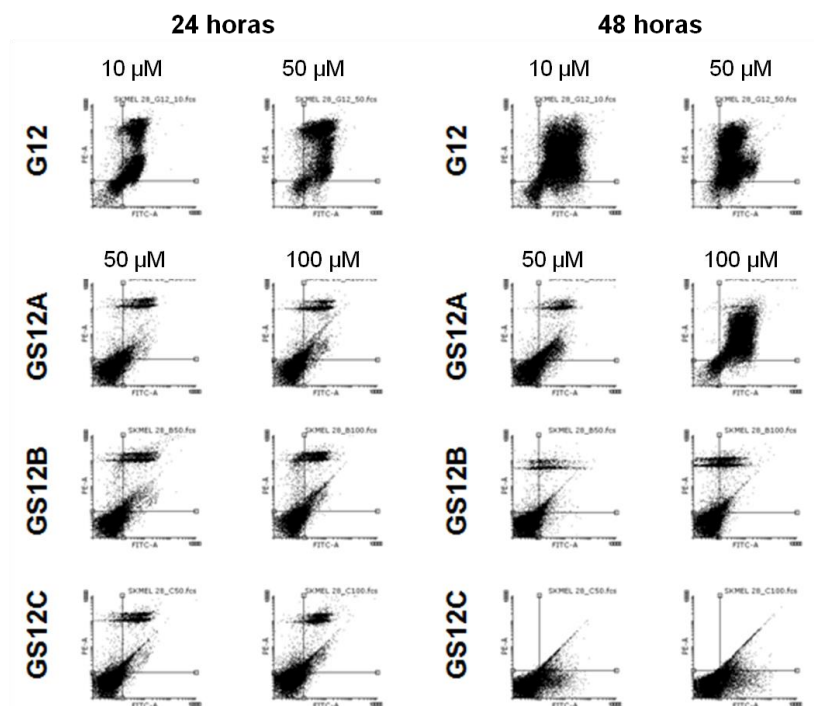


Figura 11: Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células SK-mel-28 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e os sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo e a localização no gráfico corresponde ao tipo de morte celular: apoptose (quadrante inferior direito), necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia/dupla marcação (quadrante superior direito), viáveis (quadrante inferior esquerdo).



A avaliação das características morfológicas celulares pela observação microscópica das células L1210, com dupla coloração de laranja de acridina/brometo de etídeo, auxilia na investigação de alterações que possam indicar o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos testados. Os resultados de microscopia apresentados na Figura 12 corroboram com os obtidos por citometria de fluxo com dupla marcação.

Após a exposição da linhagem L1210 aos compostos nas concentrações de 10 μM para o G12 e 100 μM para os sais por 24 horas, observa-se, um aumento do tamanho das células tratadas com GS12A e GS12B em relação ao controle, característico de sinal apoptótico recente. Nas células tratadas com G12 e GS12C, observa-se pontos centralizados e condensados do núcleo (apoptose).

A caspase-3 é uma enzima efetora que participa diretamente do processo de apoptose. A medida de caspases efetoras pode ser utilizada como ensaio auxiliar a análise da fragmentação de DNA, demonstrando que o mecanismo envolvido na indução da morte celular é o apoptótico.

Relacionando mais uma vez os resultados obtidos por citometria de fluxo e microscopia quanto à morte celular, os galatos testados promoveram um aumento da atividade da caspase-3 (Figura 13) no tempo de incubação de 4 horas, sendo mais acentuado para o GS12B. Assim, sugere-se que os compostos induziram a morte celular por apoptose.

A caspase-3 induz morte celular por regulação da Bax, Bcl-2 e p53, sendo uma via muito importante na apoptose. G8 e G12 promoveram ativação de caspase-3 em linhagens celulares de leucemia e melanoma (CHEN et al., 2011), como observado em nossos resultados.

Cordova e colaboradores (2011) verificaram o aumento na atividade da caspase-3 em linhagem B16-F10 frente ao tratamento com G8 e G12 em concentrações de 50 e 100 μM somente em tempos de incubação de 15 minutos e 1 hora. Nos tempos de incubação a partir de 2 horas até 24 horas, a atividade dessa enzima não foi alterada em relação ao controle.

Considerando que o GS12B apresenta o maior CC_{50} (181,9 μM) entre os compostos testados em células L1210, sugere-se que o G12 e os demais sais podem aumentar a atividade da caspase-3 em menores tempos de incubação.

Figura 12: Alterações nucleares características da morte celular por apoptose observadas por microscopia de fluorescência com laranja de acridina/brometo de etídeo. Células L1210 tratadas com 10 μ M de G12 e 100 μ M de GS12A, GS12B e GS12C.

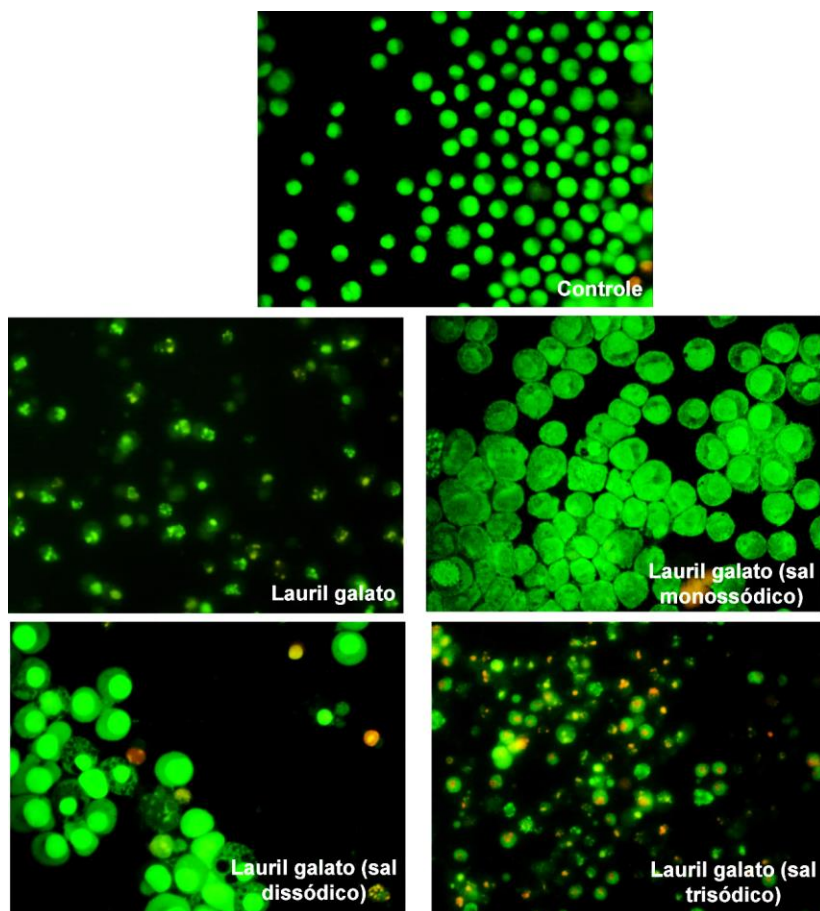
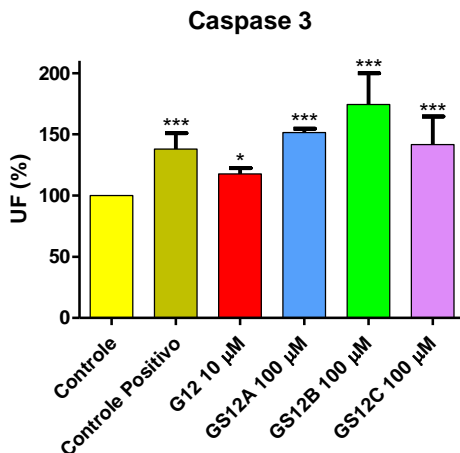


Figura 13: Avaliação do efeito do G12 (10 μ M) e os sais (100 μ M) sobre a atividade da caspase-3 em células L1210 após 4 horas de tratamento. A atividade das caspases está apresentada em percentual de unidades de fluorescência em comparação com grupo controle (células sem tratamento). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$.



Assim, sugere-se que o mecanismo de ação do G12 e os sais frente à linhagem leucêmica L1210 ativa o processo apoptótico e que provavelmente é dependente de caspase-3.

5.3 Atividade antimetastática

Considerando o aumento na busca por diferentes alternativas terapêuticas e novos alvos de ação, o presente estudo foi verticalizado para a avaliação da atividade antimetastática do G12 e do GS12A, sendo estes os compostos que apresentaram maior atividade sobre as linhagens de melanoma.

Interferências funcionais em diferentes modos de invasão são necessárias para neutralizar as diferentes estratégias que as células cancerosas têm evoluído para se mover através dos tecidos e órgãos. (WOLF et al., 2009).

A determinação do potencial migratório e invasivo das células tumorais e os mecanismos moleculares por trás deste processo são fundamentais para propor novas estratégias clínicas no diagnóstico e

prognóstico do câncer e para o desenvolvimento de medicamentos (WOLF et al., 2009; KRAMER et al., 2013).

O G12 e o GS12A, nas concentrações de 5 e 50 μM , respectivamente, inibiram a migração celular em linhagens de melanoma murino B16-F10 e humano SK-mel-28.

Na linhagem murina (Figura 14), as células sem tratamento migraram 47% em 24 horas em relação ao tempo zero, enquanto que as células tratadas com G12 e GS12A migraram 10 e 13%, respectivamente. Em 48 horas, a migração das células controle foi de 100% e a das células tratadas com G12 e o sal foi de 18 e 30%, respectivamente.

A migração das células controle sem tratamento foi de 90% na linhagem SK-mel-28 (Figura 15) em 24 horas. Nas células tratadas a migração foi de 45 e 37% com G12 e GS12A, respectivamente. Após 48 horas de tratamento, as células controle migraram totalmente (100%), enquanto que as tratadas com G12 e o sal migraram 48 e 44%, respectivamente.

A capacidade invasiva das linhagens celulares B16-F10 e SK-mel-28 foi inibida fortemente pela ação do G12 e o sal monossódico (Figura 16). Na linhagem B16-F10, a incubação com o G12 nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM inibiu a invasão celular em aproximadamente 98%, enquanto que o GS12A, nas concentrações de 50 e 75 μM , inibiu 70 e 96%. Já na linhagem de SK-mel-28, o G12, em ambas concentrações, inibiu aproximadamente 5% a invasão celular através do matrigel, enquanto que essa inibição foi de 80 e 92% para a incubação com o sal nas concentrações de 50 e 75 μM , respectivamente.

Assim como nos resultados anteriores, a inibição da migração e da invasão celular aumentou de acordo com o aumento da concentração dos compostos, sendo que as concentrações utilizadas foram baseadas na citotoxicidade, pois as mesmas não poderiam afetar muito a viabilidade celular, gerando um resultado falso-positivo. Ainda, corroborando com os resultados anteriores, o G12 teve uma ação mais acentuada em comparação ao GS12A em ambas linhagens tumorais.

Em comparação aos resultados encontrados, Cao e colaboradores (2014) verificaram que a inibição da migração celular em linhagem B16-F10 causada pela quercetina após 16 horas de incubação só foi significativa com concentrações maiores que 60 μM . E que o mesmo composto na concentração de 40 μM diminuiu significativamente a migração de células A375 e A2058 e a porcentagem de inibição da invasão celular nas mesmas linhagens foi de 30 e 50%, respectivamente. Assim, pode-se verificar que o G12 tem um efeito muito superior ao da

quercetina, pois inibe a capacidade migratória e invasiva em concentrações muito menores, e que o GS12A tem uma ação mais acentuada na inibição da invasão celular em concentrações aproximadas a da quercetina. Ainda, destaca-se que o G12 e o GS12A mantêm o efeito inibitório desta motilidade celular por mais de 48 horas, mostrando um efeito prolongado, em comparação com a quercetina.

Figura 14: Inibição da migração e motilidade de células B16-F10 frente à ação do G12 (5 μ M) e GS12A (50 μ M) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle). Utilização de meio sem soro. **A:** Imagens do processo de migração celular nos tempos 0, 24 e 48 horas após o tratamento. **B:** Quantificação da migração celular. Os resultados estão apresentados em porcentual. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$.

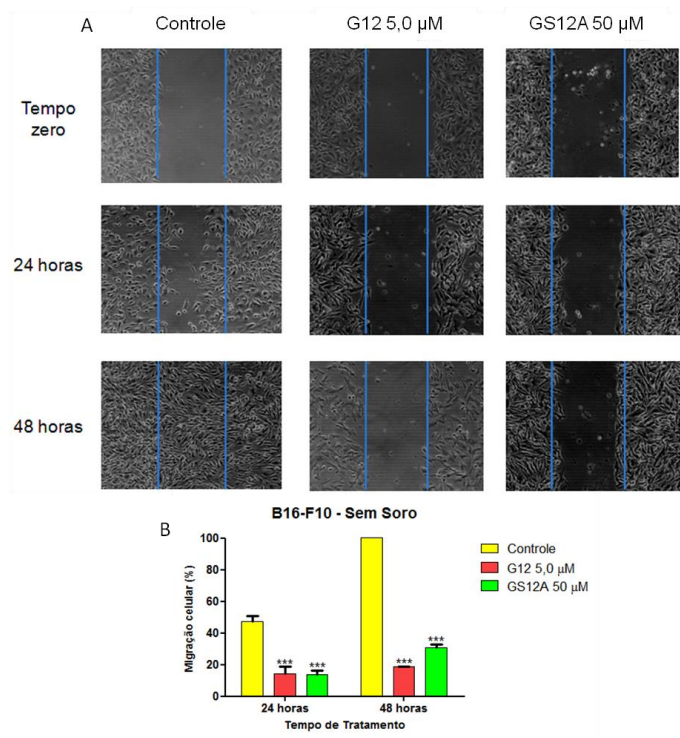


Figura 15: Inibição da migração e motilidade de células SK-mel-28 frente à ação do G12 (5 μ M) e GS12A (50 μ M) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle). Utilização de meio sem soro. **A:** Imagens do processo de migração celular nos tempos 0, 24 e 48 horas após o tratamento. **B:** Quantificação da migração celular. Os resultados estão apresentados em porcentual. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$.

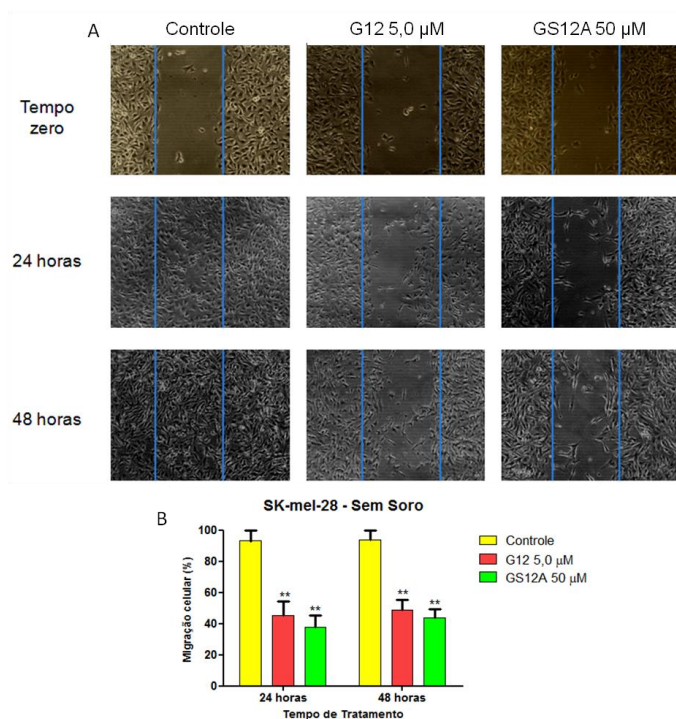
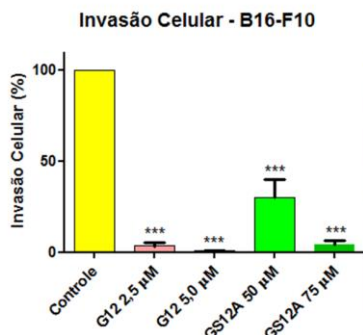
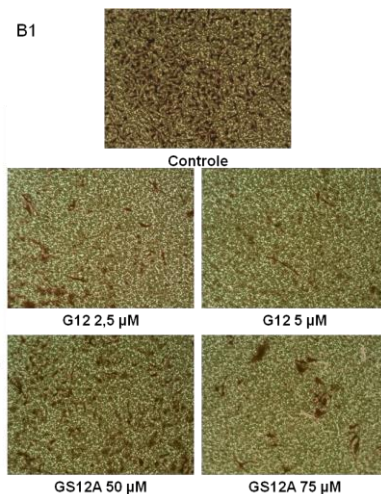


Figura 16: Efeito inibitório do G12 (2,5 e 5 μ M) e GS12A (50 e 75 μ M) na invasão de células de melanoma após 48 horas de tratamento. **A:** Quantificação da capacidade invasiva das linhagens celulares B16-F10 (A1) e SK-mel-28 (A2) tratadas em comparação com as células controle não tratadas. Os resultados estão apresentados em porcentual. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$. **B:** Visualização microscópica das células B16-F10 (B1) e SK-mel-28 (B2) com capacidade de invadir o matrigel.

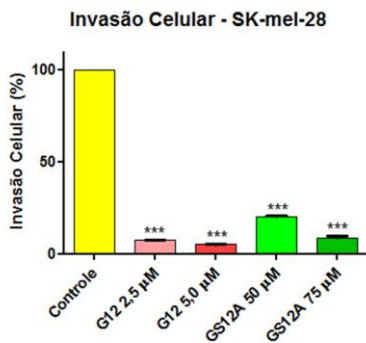
A1



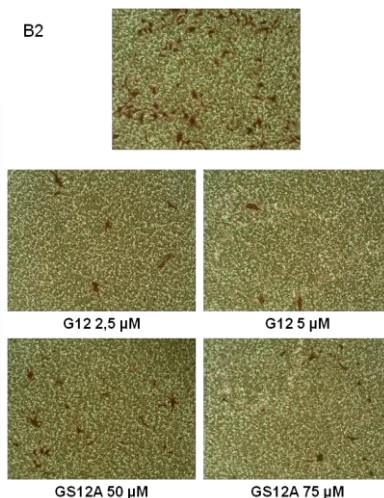
B1



A2



B2



Vários estudos indicam que a inibição da atividade ou expressão de MMPs são alvos iniciais para prevenir a metástase do câncer. Assim, os agentes que possuem a capacidade de suprimir a expressão de MMP-2 ou MMP-9 são dignos de investigação em relação à invasão e migração de células cancerígenas (WAAS et al., 2003; YOON et al., 2006; GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2008).

O efeito inibitório do G12 e do sal monossódico sobre a ação da atividade de MMPs nas linhagens de melanoma B16-F10 e SK-mel-28 foi avaliado por zimografia após 48 horas de tratamento. A visualização das bandas se dá onde há ação das MMPs por degradação da gelatina presente no gel. Quanto maior atividade enzimática, maior e mais clara é a banda visualizada. Ressalta-se ainda que, como a atividade da caspase-3, a atividade de cada MMP varia de acordo com o tempo e o estágio do tumor.

Em células B16-F10 (Figura 17), o tratamento com 0,5 μM de G12 e 50 e 75 μM de GS12A inibiu, respectivamente, 5, 10 e 15% da atividade enzimática de MMP-2, e 26, 24 e 37% da atividade de MMP-9. Já para a linhagem SK-mel-28 (Figura 18), o efeito inibitório dos compostos foi de 10, 5 e 24% na atividade de MMP-2, e 10, 4 e 6% para MMP-9. Percebe-se, assim, que os galatos promoveram maior inibição na atividade de MMP-9 liberada por células B16-F10.

Assim como demonstrado por nossos resultados, Chen e Chang (2012) verificaram que o AG, na concentração de 10 μM , diminuiu a atividade e a expressão de MMP-2 e MMP-9 em células K562 e KU812, com consequente inibição da invasão celular.

Ainda em comparação com os resultados encontrados neste estudo, Lu e colaboradores (2010) demonstraram que o AG pode reduzir a invasão de células tumorais através da regulação negativa de metaloproteinases (metalopectidase domínio 17 - ADAM17), p-Erk, e p-Akt. O tratamento de células U87 com AG nas concentrações de 20, 30, e 40 mg/ml de GA durante 24 horas diminuiu a atividade de ADAM17 em 47,9, 43,5 e 38,9%, respectivamente, em comparação com o controle.

Figura 17: Avaliação da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em células de B16-F10 após tratamento de 48 horas com G12 (0,5 μ M) e GS12A (50 e 75 μ M) em comparação com controle não tratado. **A:** Análise por zimografia. **B e C:** Quantificação da atividade da MMP-2 (B) e MMP-9 (C) verificada no ensaio de zimografia. Os resultados estão apresentados em porcentual, sendo a atividade do controle considerada 100%.

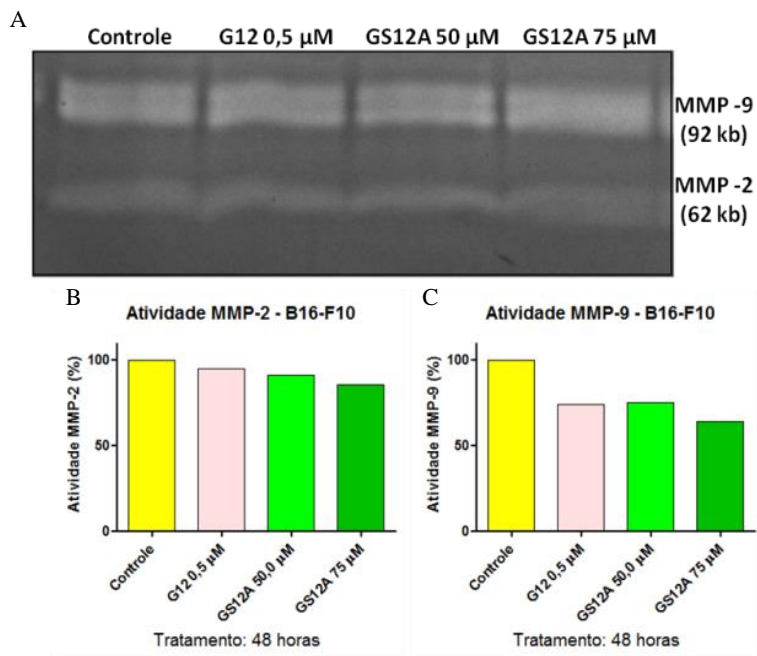
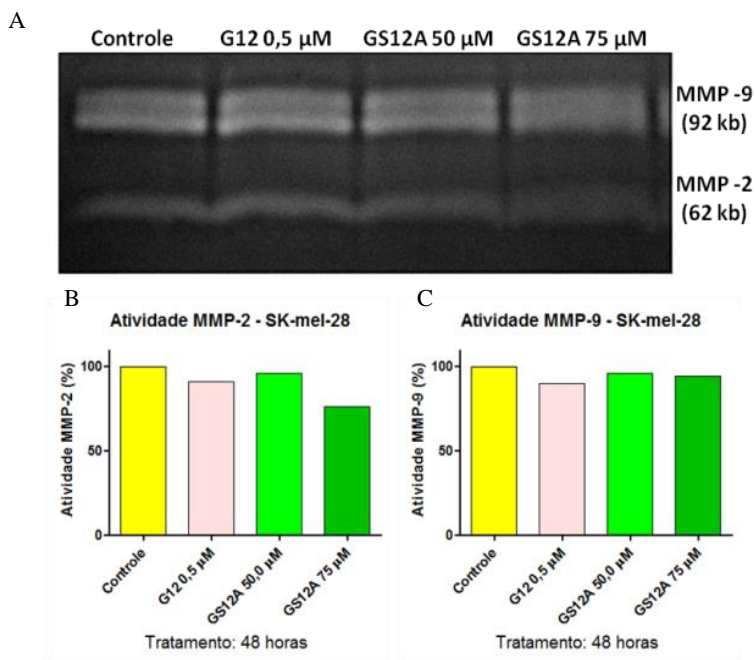


Figura 18: Avaliação da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em células de SK-mel-28 após tratamento de 48 horas com G12 (0,5 μ M) e GS12A (50 e 75 μ M) em comparação com controle não tratado. **A:** Análise por zimografia. **B e C:** Quantificação da atividade da MMP-2 (B) e MMP-9 (C) verificada no ensaio de zimografia. Os resultados estão apresentados em porcentual, sendo a atividade do controle considerada 100%.



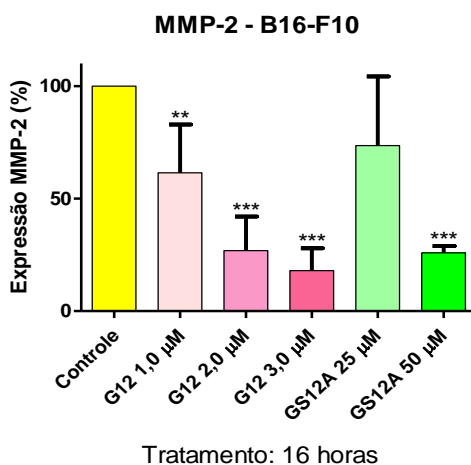
A potencial regulação negativa da expressão gênica de MMP-2 e MMP-9 pela ação dos galatos em linhagem de melanoma murino B16-F10 foi avaliada por PCR em tempo real após incubação de 16 horas com os compostos.

A Figura 19 apresenta o percentual de expressão do gene MMP-2 das células tratadas em comparação com o controle não tratado. G12, nas concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0 μ M inibiu, respectivamente, 35, 75 e 82% a expressão de MMP-2. Em concentrações de 25 e 50 μ M, o

GS12A inibiu, respectivamente, 24 e 78% a expressão do gene desta enzima. Assim como nas demais avaliações feitas neste trabalho, a regulação da expressão de MMP-2 pelos galatos é dependente da concentração.

O efeito inibitório dos galatos na expressão de MMP-9 não foi observado na mesma linhagem de melanoma B16-F10 nestas condições de tratamento. De acordo com Zhang e colaboradores (2004), a expressão das MMPs varia de acordo com o estágio e o tipo de célula tumoral, podendo justificar a diferença entre os resultados encontrados para as duas MMPs avaliadas.

Figura 19: Inibição da expressão de MMP-2 por RT-PCR em linhagem de B16-F10 frente ao tratamento com G12 (1,0, 2,0 e 3,0 μ M) e GS12A (25 e 50 μ M) em 16 horas de incubação. Os resultados estão apresentados em porcentual, sendo a expressão do gene verificada nas células controle considerada 100%.



Levando em consideração todos os resultados relacionados a uma possível atividade antimetastática, sugere-se que o efeito inibitório da capacidade invasiva e de migração de células tumorais de melanoma causado pelos compostos G12 e GS12A esteja relacionado com sua ação sobre as MMPs. Essa hipótese corrobora com diversos estudos da ação do seu precursor, o AG, assim como de outros derivados de compostos naturais.

Em 2009, Liao e colaboradores observaram que o AG suprimiu a migração e a capacidade invasiva de células de osteossarcoma humano U-2 OS e diminuiu a expressão de MMP-2 e MMP-9, sugerindo que esta ação poderia estar relacionada às vias de regulação negativa de PKC e de inibição de MAPK e PI3K/AKT, resultando na inibição da expressão de MMP-2 e MMP-9. Esse mesmo efeito do AG foi verificado por Ho e colaboradores (2010), que mostraram a inibição da migração de células de adenocarcinoma gástrico (AGS) e da expressão da MMP-2 e MMP-9 com tratamentos em concentração de 2,0 mM. Ainda pode ser verificado que várias proteínas envolvidas na metástase e na reorganização do citoesqueleto, incluindo Ras, Cdc42, Rac1, RhoA, RhoB, PI3K, p38 e MAPK, também foram inibidos pelo AG, mostrando uma relação direta entre essas vias de sinalização e a motilidade celular.

Liu e colaboradores (2011) verificaram que a ação do AG frente a células PC-3 em concentrações de 25 e 50 μ M inibiram a migração em 50 e 60%, respectivamente, em 24 horas. Esse mesmo grupo avaliou que a invasão celular foi inibida em 80 e 95% com tratamentos de 50 e 100 μ M nos tempo de incubação de 24 e 48 horas. Essa capacidade invasiva e migratória das células tumorais foi diretamente relacionada pelo grupo com a uma diminuição da atividade da MMP-2 e MMP-9, frente a incubações de 24 e 48 horas com concentrações de AG de 25 a 150 μ M.

Corroborando ainda mais com nossos resultados, Liao e colaboradores (2012) demonstraram que a ação do AG está envolvida na inibição da MMP-2 em pacientes com melanoma humano de células A375.S2. Portanto, estes dados fornecem evidência de que o AG e seus derivados, como o G12 e o GS12A, podem ser potenciais agentes para o tratamento de câncer e podem inibir significativamente a capacidade invasiva de células de melanoma.

Em comparação aos resultados encontrados em nosso estudo, a ação do G12 e do GS12A foi superior a do seu precursor, o AG, sendo mais efetivos em concentrações mais baixas. Esses dados também podem ser relacionados à estrutura dos compostos, mostrando novamente que é necessário um equilíbrio entre as características hidro e lipossolúveis, uma vez que o G12, que se mostrou o composto mais

citotóxico entre os comparados, é o que apresenta uma estrutura com ambas características: hidroxilas no anel aromático, dando características hidrossolúveis, e a cadeia lateral com 12 carbonos, caracterizando a porção lipossolúvel. Ainda, considerando a característica da forma de sal GS12A, mesmo apresentando uma atividade inferior ao G12, sua ação pode ser evidenciada em estudos *in vivo*, já que nossos resultados mostraram que o composto demonstrou uma possível ação citotóxica e antimetastática, principalmente relacionada à inibição da motilidade de células invasivas (resultados não mostrados).

Considerando que o aumento de MMPs evidencia a promoção da progressão tumoral, pois estas proteases estão relacionadas à angiogênese, e o crescimento do tumor e metástases pela degradação da MEC e/ou diminuição da ativação de fatores de crescimento (KLEIN et al., 2004), compostos de baixo peso molecular, que bloqueiam a função das MMPs, têm sido desenvolvidos e estudados. Desde então pesquisas mostraram que as células tumorais poderiam escapar da inibição de MMP usando outros mecanismos para invadir a MEC (WOLF et al., 2003; WYCKOFF et al., 2006). Assim, terapeuticamente alvo proteases em combinação com recursos adicionais de invasão das células tumorais e as migrações continuam a ser conceitos potentes para estratégias anti-câncer (CORRÊA et al., 2010; KAO, et al., 2012).

Assim, sugere-se um potencial efeito antimetastáticos do G12 e do GS12A na inibição principalmente da expressão de MMPs, já que parecem não atuar diretamente na atividade das enzimas. Para melhor elucidar a via envolvida nesta regulação negativa ensaios adicionais devem ser realizados, principalmente os relacionados às vias de ativação de MMP-2 e MMP-9. Ainda, pode ser verificado o efeito dos compostos estudados na regulação de outras MMPs, o que seria interessante na busca de estratégias terapêuticas que visem driblar os efeitos adversos e bloquear os caminhos das células tumorais para desenvolver resistência aos tratamentos.

6 CONCLUSÃO

Resumindo os resultados obtidos neste trabalho:

- O G12, como era esperado, apresentou alta citotoxicidade e seletividade para todas as linhagens tumorais estudadas, tanto em 24 horas quanto em 48 horas. Após 48 horas de tratamento, destaca-se o CC₅₀ de 5,4, 3,5 e 2,5 μ M nas linhagens L1210, B16-F10 e SK-mel-28, respectivamente.

- A atividade dos sais do G12 é dependente do tempo de incubação, sendo que o tempo de tratamento ideal é de 48 horas ou mais.

- Os sais monossódico (GS12A), dissódico (GS12B) e trissódico (GS12C) apresentaram menor citotoxicidade em 24 horas de incubação em linhagens de leucemia L1210 e HL-60.

- Os sais do G12 apresentaram maior atividade com 48 horas de incubação, com CC₅₀ entre 100 e 200 μ M frente às linhagens L1210, B16-F10 e SK-mel-28, destacando maior ação do GS12A.

- O G12 e os sais não alteraram e/ou inibiram o ciclo celular em linhagens L1210, B16-F10 e SK-mel-28.

- A proliferação celular e capacidade de formar colônias foi inibida pelo G12 e os sais em concentrações subletais nas linhagens B16-F10 e SK-mel-28.

- A fragmentação de DNA causada pelos compostos nas linhagens L1210, B16-F10 e SK-mel-28 é concentração-dependente.

- O mecanismo de morte celular ativado pelos compostos nas linhagens L1210, B16-F10 e SK-mel-28 é a apoptose e o efeito é tempo e concentração dependentes.

- Alterações morfológicas típicas de apoptose foram causadas pela ação dos galatos estudados em linhagem celular de L1210.

- Os compostos promoveram ativação da caspase-3 em células L1210.

- O G12 e GS12A promoveram a inibição da migração e invasão celular em linhagens de melanoma murino (B16-F10) e humana (SK-mel-28), indicando efeitos antimetastáticos *in vivo*.

- O G12 e o GS12A promoveram a inibição da expressão de MMP-2 em linhagem B16-F10, sendo um efeito dependente da concentração. A inibição da atividade da MMP-9 não foi alterada.

Baseados neste cenário, conclui-se que, embora dados adicionais sejam necessários, consideramos que o G12 e o respectivo sal

monossódico apresentam grande potencial para seguir com testes clínicos, dadas a baixa toxicidade in vitro e in vivo e alta seletividade às células tumorais.

7 PERSPECTIVAS

Os estudos *in vivo* já foram iniciados e, até o presente momento, pode-se verificar que o G12 e os sais não causam toxicidade em camundongos da linhagem Swiss. Para dar continuidade, os testes de avaliação antitumoral e antimetastáticos serão realizados em camundongos isogênicos, buscando uma homogeneidade nos resultados.

REFERÊNCIAS

AIMES, R. T., QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 5872–5876, 1995.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p.1133, 2004.

ALMEIDA, V.L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALMOG, N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. **Cancer Lett.**, v. 294, p. 139–146, 2010.

ALTMAN, B. J.; RATHMELL, J. C. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, n.9, 2012.

ANCEREWICZ, J., et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 1, p. 113-20, 1998.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H.; KROMHOUT, D. Chocolate as a source of tea flavonoids. **Lancet**, v. 354, n. 9177, p. 488, 1999.

BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci**, 115:3719-27, 2002.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v.21, n.6, p.167-223, 2000.

BEVERS, E. M. *et al.* Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, p. 317-330.1999.

BJÖRKLUND, M., KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1755:37-69, 2005.

BLACKBURN, J.S. *et al.* RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. *Cancer Res.*, v. 67, p. 10849–10858, 2007.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: Apoptose em glomerulopatias. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer: Leucemias**. Rio de Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/subtipos>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil**. INCA (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva). Rio de Janeiro, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2013.

BRENNA, S.M., SYRJANEN, K.J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Med J.*, v. 121, p. 128-32, 2003.

BUTTNER, S. *et al.* Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol Cell*, v. 25, p. 233–246, 2007.

CAMPBELL, P. M.; DER, C. J. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, v.14, p. 105-114, 2004.

CAO, H. et al. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3. **Biochemical Pharmacology**, 2014.

CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v.23, p.2825-2837, 2004.

CASTEDO, M., PERFETTINI, J.L., *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene** v. 23, p. 2825-2837, 2004.

CHAI, J. et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. **Nature**, v. 406, p. 855–862, 2000.

CHAKRABARTIL et al. Carbon nanotubes in cancer therapy, including boron neutron capture therapy (BNCT). **Nanotechnol. Life. Sci.**, v. 16, p. 403-418, 2012.

CHAKRABARTY, A. & GEISSE, J.K. Medical therapies for non-melanoma skin cancer. **Clin Dermatol** n. 22, p.183-188, 2004.

CHAMBERS, A.F., GROOM, A.C., MacDONALD, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 563–572, 2002.

CHAN, J.M., et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery. **Methods in molecular biology**, v. 624, pp. 163-175, 2010.

CHAUDHARY, A. K. et al. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies. **Mutation Research**, v. 753, p. 7–23, 2013.

CHEN, Y-J; CHANG, L-S. Gallic acid downregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in human leukemia cells with expressed Bcr/Abl. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 56, p. 1398-1412, 2012.

Chen, C.-H., et al. Role of redox signaling regulation in propyl gallate-induced apoptosis of human leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 494-501, 2011.

CHEN, H.-M., et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v. 286, n. 2, p. 161-71, 2009.

CHEN, Q., et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36027-31, 2003.

CHO, H.J. et. al. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1104–1110, 2007.

CHOTIA, J. & JONES, E.Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. **Annu Rev Biochem** v. 66, p. 823-862, 1997.

CLARKE, P. R.; ALLAN, L. A. Cell-cycle control in the face of damage – a matter of life or death. **Trends in Cell Biology**. v.19, n.3, p.89-98, 2009.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. **The cell cycle and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.2776–2778, 1997.

COMPTON, M.M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metastasis Rev** n. 11, 1992.

CORDOVA, C., et al. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 8, p. 2025-34, 2011.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Robbins: **Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

COUSSENS, L.M., WERB, Z.. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. **Chem. Biol.**, v. 3, p. 895–904, 1996.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine**, v.358, p.502-511, 2008.

CURTIN, J.F., DONOVAN, M., COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J Immunol Methods** n. 265, 2002.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-19, 2004.

DERYUGINA, E.I., QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer metast Rev**, 25:9-34, 2006.

DIMRI, GP. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell** v. 7, p. 505-512, 2005.

EBERHARDT, W. et al. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. **J. Immunol.**, v. 165, p. 5788–5797, 2000.

EDINGER, A.L., THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr Opin Cell Biol** V. 16(6), 2004.

EGEBLAD, M., WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 161–174, 2002.

EGER, A., MIKULITS, W. Models of epithelial–mesenchymal transition. **Drug Discov. Today: Dis. Models**, v. 2, p. 57–63, 2005.

EISEN, A., JEFFREY, J., GROSS, J. Human skin collagenase, Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 151, p. 637–645, 1968.

ELLEEDGE, S. J. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. **Science**, v.274, 1996.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends in Cell Biology**, v.23, n.12, p.620-633, 2013.

FIDLER, I.J. Cancer biology is the foundation for therapy. **Cancer Biol. Ther.**, v. 4 (2005), p. 1036–1039, 2005.

FIDLER, I.J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-20-deoxyuridine. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 45, p. 773–782, 1970.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, 2005.

FIUZA, S., GOMES, C.L., *et al.* Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties a structure activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorg Med Chem** v. 12, p. 3581-3589, 2004.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* **Nat. Protoc.** 2006.

FRIEDL, P., WOLF, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. **J. Cell Biol.**, v. 188, p. 11–19, 2010.

FUJITA, K. I.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 193-201, 2002.

GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GALLUZI, L., *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p.107–120, 2012.

GIFTSON, J.S.; JAYANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 28, n. 3, p. 251-9, 2010.

GRIMM, D. *et al.* Drugs Interfering with Apoptosis in Breast Cancer. **Current Pharmaceutic Designs**, v. 17, p. 272-283, 2011.

GUPTA, G.P., MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, p. 679-695, 2006.

GURUVAYOORAPPAN, C., KUTTAN, G. Amentoflavone inhibits experimental tumor metastasis through a regulatory mechanism involving MMP-2, MMP-9, prolyl hydroxylase, lysyl oxidase, VEGF, ERK-1, ERK-2, STAT-1, NM23 and cytokines in lung tissues of C57BL/6 mice. **Immunopharmacol. Immunotoxicol**, v. 30, p. 711–727, 2008.

HAHM, E.R.; SINGH, S.V. Withaferin A-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell is Associated with Suppression of Inhibitor of Apoptosis Family Protein Expression. **Cancer Letters**. 334, p. 101-108, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HIRANO, T. et al. Identification of novel small compounds that restore E-cadherin expression and inhibit tumor cell motility and invasiveness **Biochemical Pharmacology**, v. 86, p. 1419–1429, 2013.

HO, H.-H. et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NFκB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2508-2516, 2010.

HOFFMAN UB, HOUBEN R, BRÖCKNER EBM, et al. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochim**, 87:307-14, 2005.

HORWITZ, A.F., WEBB, D.J., ZHANG, H. Cell Migration: an overview. Methods in.

HSU, F.-L.; CHANG, H.-T.; CHANG, S.-T. Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 734-8, 2007.

HU, W. et al. Anticancer properties of 10-hidroxycompotothecin in a murine melanoma pulmonary metastasis model in vitro and in vivo. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 513-520, 2011.

INCA - **Instituto Nacional de Cancer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 22 de novembro de 2013.

INOUE, M., et al. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, n. 2, p. 898-904, 1994.

INOUE, M., et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 11, p. 1526-30, 1995.

INOUE, M., et al. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. **Biol Pharm Bull** v. 23(10), p. 1153-1157, 2000.

ISUZUGAWA, K.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Ca²⁺ -dependent caspase activation by gallic acid derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 844-7, 2001.

JIANG, Y., GOLDBERG, I.D., SHI, Y.E. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. **Oncogene**, 21:2245-52, 2002.

JONES, V. KATIYAR, S. K. Emerging phytochemicals for prevention of melanoma invasion. **Câncer letters**, v. 335, p. 251-258, 2013.

JOYCE, J.A., POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis, **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 239–252, 2009.

JOZA, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, p. 549–554, 2001.

JUHÁSZ, A. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypofaryngeal cancers. **Laryngoscope**, v. 110, p. 84-92, 2000.

KAJANNE, R. et. al. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. **J. Cell. Physiol.**, v. 212, p. 489–497, 2007.

KAO, S.J. et al. Osteostatin inhibits the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells via suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 261, p. 105–115, 2012.

KAWADA, M., et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anti-Cancer Drugs**, v. 12, n. 10, p. 847-52, 2001.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221-37, 2011.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 1972.

KESSENBROCK, K., PLAKS, V., WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, p. 52–67, 2010.

KIM, D. et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J.**, v. 15, p. 1953–1962, 2001.

KLEIN, A. et al. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. **Toxicol.**, v. 57, p. 1–8, 2011.

KLEIN, C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases, **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 302–312, 2009.

KLEINER, D.E., STETLER-STEVENSON, W.G. Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 325-329, 1994.

KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research**, v. 752, p. 10-24, 2013.

KROEMER G, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differentiation**, v.16, p.3-11, 2009.

KROEMER G, LEVINE B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v.9, n.12, p.1004-10, 2008.

KUNIGAL, S. et. al. RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloprotease-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 2307–2316, 2007.

LEAL, P.C., et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793-6, 2009.

LEITE, M. et al. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. **Analytical Cell Pathology**. v19, p.139-151, 1999.

LI, X., WU, J.F. Recent developments in patent anti-cancer agents targeting the matrix metalloproteinases (MMPs). **Recent Pat. Anticancer Drug Discov.**, v. 5, p. 109–141, 2010.

LIAO, T. T. et al. .Sensitivity of morphological change of Vero cells exposed to lipophilic compounds and its mechanism. **Journal of Hazardous Materials**. v.179 , p.1055-1064, 2010.

LIAO, C. L. et al., Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1734-1740, 2012.

LINDQVIST A., et al. Cyclin B1–Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. **PLoS Biology**, v.5, n.5, e123, 2007.

LIU, K.-C. et al. Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix

metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. **Oncology reports**, v. 26, p. 177-184, 2011.

LO, C. et al. Gallic acid inhibits the migration and invasion of A375.S2 human melanoma cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and Ras. **Melanoma Research**, v. 21, p. 267-273, 2011.

LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Investigational New Drugs**, p. 1-10, 2011.

LOCATELLI, C., et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3791-9, 2008.

LOCATELLI, C., et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 2, p. 175-84, 2009.

LOCATELLI, C., MONTEIRO, F., CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters gallic acid as anticâncer agentes: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013.

LONGO, D. L. Principles of cancer treatment. In: LONGO, D. L. et al. (Eds.) **Harrison's Hematology and Oncology**. New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2010, p.-344-373.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 641, p. 102-107, 2010.

LUM, J.J., DEBERARDINIS, R.J., THOMPSON, C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol** v.6, p. 439-448, 2005.

MAMEDE, M.E.O.; CARDELLO, H.M.A.B.; PASTORE, G.M.

Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 63-8, 2005.

McGARY, E.C., LEV, D.C., *et al.* Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Cancer Biol Ther** v. 1(5), p. 459-465, 2002.

MEHLEN, P., BREDESEN, D.E. Dependence receptors: from basic research to drug development. **Sci Signal**, v. 4, 2011.

MEHLEN, P., PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 449–458, 2006.

MEKAPATI, S.B., *et al.* The role of hydrophobic properties of chemicals in promoting allosteric reactions. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3737-62, 2005.

MEYSKENS JR., F.L., *et al.* Activation of nuclear factor- κ B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1197-1202, 1999.

NITTA, M. *et al.* Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. **Oncogene**, v. 23, p. 6548-6558. 2004.

OHNO, T., INOUE, M., OGIHARA, Y. **Anticancer Res.**, v. 21, p. 3875-3880, 2001.

ORTEGA, E., *et al.* Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 6, p. 940-943, 2003.

OW, Y.Y., STUPANS, I. Gallic acid and gallic derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr Drug Metab**, v. 4(3), p. 241-248, 2003.

PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin Liver Dis**, v. 4, 2000.

PATTERSON, M. L. et al., Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP- 2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS Lett.**, v. 503, p. 158–162, 2001.

PENET, M.F.; ARTEMOV, D.; FARAHANI, K.; BHUJWALLA, Z.M. MR-Eyes for cancer: looking within an impenetrable disease. **NMR Biomed.**, v. 26, p. 745-755, 2013.

PIMIENTO, J.M. et al. Melanoma genotypes and phenotypes get personal. **Pathobiology in focus**, v. 93, p. 858–867, 2013.

PORTUGAL, P.; MANSILLA, S.; BATALLER, M. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, p.69-78, 2010.

RELLO-VARONA, S. et al. An automated fluorescence videomicroscopy assay for the detection of mitotic catastrophe. **Cell Death and Disease**, v.1, n.2, e.25, 2010.

RIEDL, S. J; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 897-906, 2004.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**, v.32, n.7, p.955-63, 2011.

ROTTER, V.; WOLF, D. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells (human p53 cDNA/c-myc amplification), **Cell Biology**, v. 82, p. 790-794, 1985.

ROY, G., et al. Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by Lauryl Gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 2, p. 206-14, 2000.

ROY, R., YANG, J., MOSES, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, p. 5287–5297, 2009.

SAKAGUCHI, N.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 12, p. 1973-81, 1998.

SALUCCI, M. et al. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2), **Br.J. Cancer**, v. 86, p. 1645e1651, 2002.

SATO, T. et. al. Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. **Cancer Res.**, v. 62, p. 1025–1029, 2002.

SERRANO, A., et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 350, n. 1, p. 49-54, 1998.

SHIN, Y., et. al. PMA induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKC α -NF- κ B cascade in human lung epithelial cells. **Exp. Mol. Med.**, v. 39, p. 97–105, 2007.

SNOEK-VAN BEURDEN, P.A.M., VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, p. 73-83, 2005.

STANLEY, M.A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, v. 15, p. 663-76, 2001.

SUSIN, S.A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, p. 441–446, 1999.

THOMPSON, E.B. The many roles of c-Myc apoptosis. **Annu Rev Physiol** n. 60, 1998.

VÄISÄNEN, A. et al. A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. **Human Pathology**, v. 42, p. 1103–1111, 2011.

VALENTE, P., FASSINA, G., MELCHIORI, A. et al. TIMP-2 overexpression reduces invasion and angiogenesis and protect B16F10 melanoma cells from apoptosis. **Int J Cancer**, 75:246, 1998.

VAN DEN STEEN, P. E. et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, p. 375–536, 2002.

VANDE WALLE L. et al. Proteome-wide identification of HtrA2/Omi substrates. **J Proteome Res.**, v. 6, p. 1006–1015, 2007.

VASALA, K., PAAKKO, P., TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. **Urology**, v.62, p. 952-959, 2003.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v. 84, n. 10, p. 627-39, 2005.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE; D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p.131–149, 2003.

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 12, p.385-392, 2011.

WAAS, E.T. et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. **Br. J. Surg.**, v. 90, p. 1556–1564, 2003.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-55, 1998.

WANG, Z. Y., CHEN, Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. **Lancet Oncol** v. 1, p. 101-106, 2000.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em 17 de dezembro de 2013.

WHO - **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>, Acesso em: 20 de dezembro de 2013.

WILLIS, L. et al. Breast cancer dormancy can be maintained by small numbers of micrometastases. **Cancer Res.**, v. 70, p. 4310–4317, 2010.
WOLF, K. et al. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 931–941, 2009.

WOLF, K. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 267–277, 2003.

WU, J.; SUN, J.; XUE, Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. **Toxicology Letters**, v.199, n.3, p.269-276, 2010.

WU, P. C. *et al.* Accelerated Cellular Senescence in Solid Tumor Therapy. **Experimental Oncology**, v. 34, ed. 3, p. 298-305, 2012.

WYCKOFF, J.B. et al. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumorcell invasion in vivo. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 1515–1523, 2006.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Res** n. 5, 1985.

YANG, L.; WU, S.;ZHANG, Q.; LIU, F.; WU, P. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**, v. 256, n.2, p.267-278, 2007.

YANG, Y.; WANG, H. Perspectives of nanotechnology in minimally invasive therapy of breast cancer. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 4 (1), p. 67-86, 2013.

YOON, S.O. et al. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. **Mol. Cancer Ther.**, v. 5, p. 2666–2675, 2006.

YOSHIOKA, K. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines, **Oncol. Rep.**, v. 7, p. 1221e1223, 2000.

ZHANG, L. et al. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, v. 7, p. 327–332, 2004.

ZHANG, Y. *et al.* Nano rare-earth oxides induced size-dependent vacuolization: an independent pathway from autophagy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 601-609, 2010.

ZIJL, F.V., KRUPITZA, G., MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research**, v. 728, p. 23–34, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Editora Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, cap. 23, p. 489-516, 2000.

APÊNDICE A – Avaliação do Ciclo Celular: Histogramas

Figura 1: Histogramas representativos da avaliação do ciclo celular de células L1210 frente à ação do G12 (10 e 50 μM) e dos sais (50, 100 e 200 μM) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle).



Figura 2: Histograma da avaliação do ciclo celular de células B16-F10 frente à ação do G12 (10 e 50 μM) e dos sais (50, 100 e 200 μM) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle).

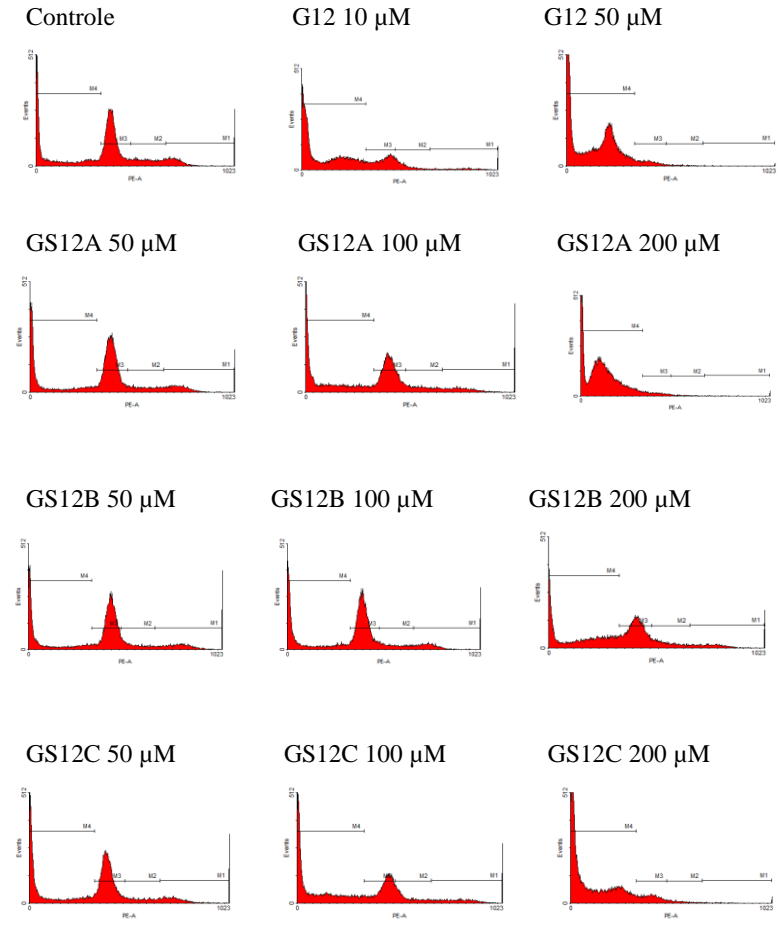
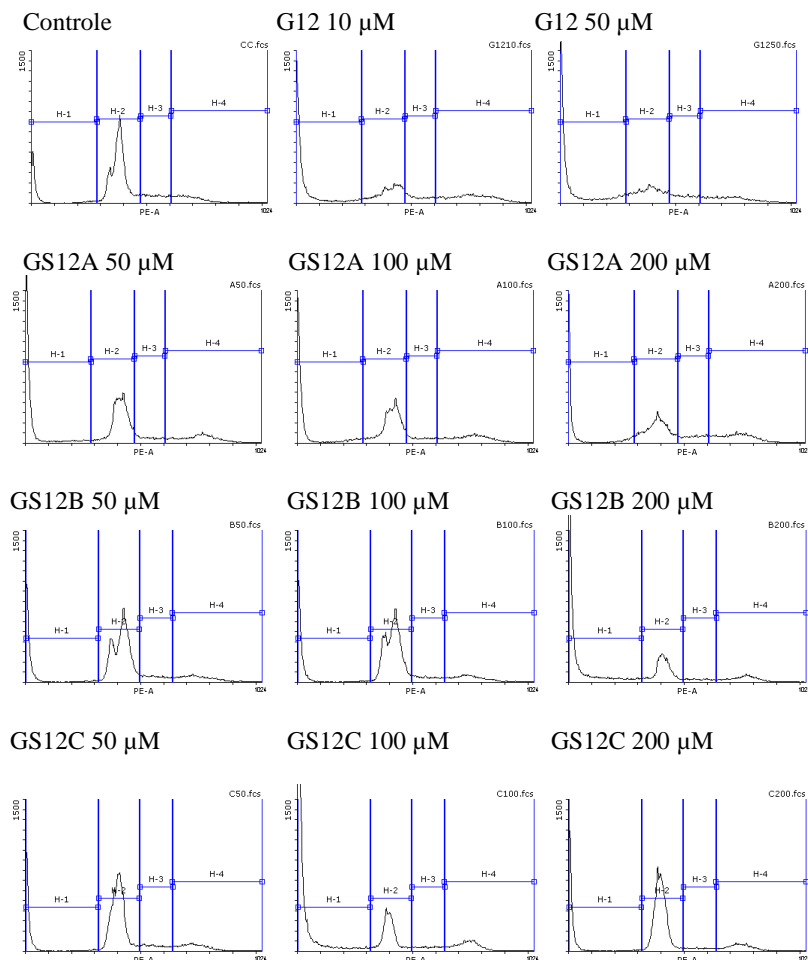


Figura 3: Histograma da avaliação do ciclo celular de células SK-mel-28 frente à ação do G12 (10 e 50 μM) e dos sais (50, 100 e 200 μM) após 48 horas de tratamento, em comparação com células não tratadas (controle).



APÊNDICE B – Avaliação do tipo de morte celular: Tabelas com o percentual de células por quadrante em gráficos de pontos

Tabela 1: Representação da dispersão celular (%) avaliadas por citometria de fluxo. Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células L1210 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e seus sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo.

	% de células L1210 em cada quadrante – 24 horas			
	Viáveis	Apoptose	Necrose	Apoptose tardia
Controle	96,02158	0,529467	0,35861	3,090341
G12 10 μM	55,76993	2,276557	12,44003	29,51348
G12 50 μM	31,33845	1,818053	24,53651	42,30698
GS12A 50 μM	47,32933	2,256392	16,71526	33,69902
GS12A 100 μM	63,50863	2,797869	7,339842	26,35366
GS12B 50 μM	65,29432	7,213019	4,382094	23,11057
GS12B 100 μM	60,74592	10,99734	5,175045	23,0817
GS12C 50 μM	71,82428	8,969791	2,936143	16,26979
GS12C 100 μM	68,37239	8,712692	3,166593	19,74833
	% de células L1210 em cada quadrante – 48 horas			
	Viáveis	Apoptose	Necrose	Apoptose tardia
Controle	98,54069	0,487986	0,139425	0,8319
G12 10 μM	36,77815	9,582819	23,26455	30,37447
G12 50 μM	39,21064	12,68485	19,33326	28,77125
GS12A 50 μM	71,30282	4,247633	2,808141	21,6414
GS12A 100 μM	25,01845	4,356746	8,357318	62,26749
GS12B 50 μM	72,45701	6,83375	7,431199	13,27804
GS12B 100 μM	60,88038	5,272334	4,205039	29,64225
GS12C 50 μM	74,15716	3,77573	4,229109	17,838
GS12C 100 μM	49,44374	4,273818	10,26639	36,01605

Tabela 2: Representação da dispersão celular (%) avaliadas por citometria de fluxo. Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células B16-F10 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e seus sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo.

	% de células B16-F10 em cada quadrante – 24 horas			
	Viáveis	Apoptose	Necrose	Apoptose tardia
Controle	98,41029	0,425591	0,394077	0,770038
G12 10 μM	67,10996	1,173799	10,49812	21,21812
G12 50 μM	37,62637	3,559528	48,433	10,3811
GS12A 50 μM	92,49695	1,119844	3,752643	2,630567
GS12A 100 μM	90,51483	0,844724	5,490421	3,150024
GS12B 50 μM	84,41226	1,505387	5,79615	8,286199
GS12B 100 μM	85,89455	2,064565	5,16509	6,875795
GS12C 50 μM	84,86335	2,668453	6,598886	5,869314
GS12C 100 μM	82,21126	4,099408	3,37192	10,31741
	% de células B16-F10 em cada quadrante – 48 horas			
	Viáveis	Apoptose	Necrose	Apoptose tardia
Controle	99,21882	0,277249	0,161665	0,342262
G12 10 μM	8,945716	14,89681	1,528213	74,62926
G12 50 μM	3,681334	21,48344	2,089624	72,7456
GS12A 50 μM	41,27881	4,676675	19,04627	34,99825
GS12A 100 μM	10,10576	5,861222	7,595895	76,43712
GS12B 50 μM	61,52992	6,694534	11,78739	19,98816
GS12B 100 μM	54,76382	8,747077	2,962589	33,52652
GS12C 50 μM	49,39307	5,721742	9,845609	35,03957
GS12C 100 μM	34,05113	6,08145	20,62732	39,24009

Tabela 3: Representação da dispersão celular (%) avaliadas por citometria de fluxo. Tipo de morte celular (tempo e concentração dependente). Gráfico de pontos das células SK-mel-28 tratadas com G12 (10 e 50 μM) e seus sais (50 e 100 μM) em 24 e 48 horas de tratamento. As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo.

	% de células SK-mel-28 em cada quadrante – 24 horas			
	Viáveis	Apoptose	Necrose	Apoptose tardia
Controle	96,72925	1,440575	0,782898	1,014815
G12 10 μM	27,20722	3,464186	6,841739	62,30059
G12 50 μM	5,033337	2,539447	3,774445	88,61336
GS12A 50 μM	70,78262	3,052782	10,46337	15,52776
GS12A 100 μM	70,02132	1,851302	10,29406	17,67843
GS12B 50 μM	74,53009	2,794491	5,911361	16,6793
GS12B 100 μM	68,33368	1,395234	13,78777	16,36314
GS12C 50 μM	76,58685	1,777099	7,163523	14,39404
GS12C 100 μM	70,10094	1,683812	11,66407	16,42159
	% de células SK-mel-28 em cada quadrante – 48 horas			
	Viáveis	Apoptose	Necrose	Apoptose tardia
Controle	96,91794	1,723177	0,317901	1,040985
G12 10 μM	4,469477	3,720201	0,505166	91,30516
G12 50 μM	1,386882	3,847656	2,811176	91,95429
GS12A 50 μM	70,18259	4,373108	4,002365	21,44194
GS12A 100 μM	4,621014	3,131591	0,422749	91,82465
GS12B 50 μM	81,14634	3,55123	4,643498	10,65893
GS12B 100 μM	75,31235	1,924618	11,00868	11,75435
GS12C 50 μM	79,81589	8,303343	2,274709	9,606055
GS12C 100 μM	74,4357	11,15397	2,317033	12,0933

